

Entwicklung und Optimierung einer Methode zur Charakterisierung un- bekannter Substanzen mittels Gas- chromatographie - ultra-hochauflö- sender Massenspektrometrie und chemischer Ionisierung unter Atmo- sphärendruck

Kumulative Dissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

eingereicht von Theo Schwemer, geb. am 04.10.1983 in Rostock,

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002681

Rostock, 30.11.2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2012 bis Dezember 2016 am Institut für Chemie der Universität Rostock am Lehrstuhl für Analytische Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Zimmermann angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Ralf Zimmermann
Universität Rostock
18059 Rostock

Datum der Einreichung:

31.10.2019

Datum der Verteidigung:

28.01.2020

Zweitgutachter

Prof. Dr. Andreas Römpp
Universität Bayreuth
95326 Kulmbach

"Wenn man das Unmögliche ausgeschlossen hat, muss das, was übrig bleibt,
die Wahrheit sein, so unwahrscheinlich sie auch klingen mag."

The Adventure of the Beryl Coronet / Sherlock Holmes

ARTHUR CONAN DOYLE

Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, 30.11.2019



.....
Theo Schwemer

Erklärung zur Abfassung der Manuskripte zur kumulativen Dissertation

Folgende Manuskripte wurden von Theo Schwemer als Haupt- bzw. Co-Autor in wissenschaftlichen Fachzeitschriften (peer-reviewed) publiziert. Sie stellen die Grundlage für die vorliegende kumulative Dissertation dar. Der Anteil von Theo Schwemer an den Arbeiten ist jeweils kurz dargestellt.

1. **Theo Schwemer**, Christopher P. Rüger, Martin Sklorz, and Ralf Zimmermann; *Gas Chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization FT-ICR mass spectrometry for improvement of data reliability; Analytical chemistry* 87.24 (2015): 11957-11961. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02114

Theo Schwemer war für den Aufbau des Messgerätes und der Messmethode verantwortlich, plante und führte die Messungen aus. Er führte die Datenanalyse durch und schrieb das Manuskript.

2. **Theo Schwemer**, Thorsten Rössler, Björn Ahrens, Marion Schäffer, Alexandra Hasselbach-Minor, Michael Pütz, Martin Sklorz, Thomas Gröger, Ralf Zimmermann, et al. "Characterization of a heroin manufacturing process based on acidic extracts by combining complementary information from two-dimensional gas chromatography and high resolution mass spectrometry." *Forensic Chemistry* 4 (2017): 9-18. DOI: 10.1016/j.forc.2017.02.006

Theo Schwemer führte Messungen durch, übernahm einen Teil der Datenauswertung und arbeitete am Manuskript und Erstellung der Graphiken.

3. **Theo Schwemer**, Uwe Käfer, Christopher P. Rüger, Martin Sklorz, Ralf Zimmermann, *Application of gas chromatography coupled to ultra-high resolution mass spectrometry for the analysis of bitumen aging*

Theo Schwemer plante und führte die Messungen aus. Er war für die Datenanalyse verantwortlich und schrieb das Manuskript.

4. Christopher P. Rüger, Toni Miersch, **Theo Schwemer**, Martin Sklorz, and Ralf Zimmermann, "Hyphenation of thermal analysis to ultrahigh-resolution mass spectrometry (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry) using atmospheric pressure

chemical ionization for studying composition and thermal degradation of complex materials." *Analytical chemistry* 87.13 (2015): 6493-6499. DOI: 10.1021/acs.anal-chem.5b00785

Theo Schwemer führte einen Teil der Messungen und die Datenauswertung durch.

5. Rüger, Christopher P., Martin Sklorz, **Theo Schwemer**, Ralf Zimmermann, "Characterisation of ship diesel primary particulate matter at the molecular level by means of ultra-high-resolution mass spectrometry coupled to laser desorption ionisation—comparison of feed fuel, filter extracts and direct particle measurements." *Analytical and bioanalytical chemistry* 407.20 (2015): 5923-5937. DOI 10.1007/s00216-014-8408-1

Theo Schwemer führte einen Teil der Messungen und die Datenauswertung durch.

6. Oeder, Sebastian, et al. "Particulate matter from both heavy fuel oil and diesel fuel shipping emissions show strong biological effects on human lung cells at realistic and comparable in vitro exposure conditions." *PloS one* 10.6 (2015): e0126536. DOI: 10.1371/journal.pone.0126536

Theo Schwemer führte einen Teil der Messungen und die Datenauswertung durch.

7. Streibel, Thorsten, et al. "Aerosol emissions of a ship diesel engine operated with diesel fuel or heavy fuel oil." *Environmental Science and Pollution Research* 24.12 (2017): 10976-10991. DOI 10.1007/s11356-016-6724-z

Theo Schwemer führte einen Teil der Messungen und die Datenauswertung durch.

8. Rüger, Christopher P., **Theo Schwemer**, Martin Sklorz, Peter B O'Connor, Mark P Barrow and Ralf Zimmermann, "Comprehensive chemical comparison of fuel composition and aerosol particles emitted from a ship diesel engine by gas chromatography atmospheric pressure chemical ionisation ultra-high resolution mass spectrometry with improved data processing routines." *European Journal of Mass Spectrometry* 23.1 (2017): 28-39. DOI: 10.1177/1469066717694286

Theo Schwemer führte einen Teil der Messungen und die Datenauswertung durch.

Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Zimmermann dafür bedanken, dass ich in dieser Arbeitsgruppe die Möglichkeit bekommen habe, meine Dissertation anfertigen zu dürfen. Durch die freundliche und engagierte Betreuung, durch Dr. M. Sklorz und Dr. T. Streibel, hat mir diese Arbeit viel Freude bereitet. Sie standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe, die mir jederzeit bei Fragen hilfreich zur Seite stand. Im Besonderen möchte ich Christopher Rüger danken, der mich während meiner Promotion immer unterstützt hat und bei Fragen und Problemen hilfreich zur Seite stand.

Auch meiner langjährigen Kommilitonin Sabrina Radischat möchte ich meinen Dank aussprechen. Sie war mir immer eine verlässliche Praktikumpartnerin und Freundin.

Ich danke außerdem meinen Eltern und meiner gesamten Familie, die mich in allen Lebenslagen unterstützen.

Nicht zuletzt gilt ein besonderer Dank meiner Frau Karoline und meinen Kindern. Sie geben mir stetig Kraft, unterstützen mich und spornen mich an, stets mein Bestes zu geben. Ihr habt immer an mich geglaubt und ohne euch wäre mein Leben um vieles ärmer.

Zusammenfassung

Die Charakterisierung von hochkomplexen Probengemischen aus mehreren tausenden Substanzen stellt eine Herausforderung für die analytische Chemie dar und bedarf leistungsfähiger Techniken. Die Massenspektrometrie, insbesondere die hochauflösende Massenspektrometrie, ist eine Methode, die schon in vielen Forschungsgebieten einen substanziellen Beitrag zur Beschreibung komplizierter Gemische auf molekularer Ebene geleistet hat. Trotz einfacherer und schnellerer Probenaufgabe ohne weiteres Kopplungssystem, birgt die Verwendung einer chromatographischen Trennung als Einlasssystem für das Massenspektrometer einige Vorteile für die Separierung und Identifizierung von unbekannten Substanzen. Zum einen ermöglicht die Gaschromatographie die Auftrennung isomerer Verbindungen, zum anderen den Vergleich der Elutionszeiten und anderer Molekülinformationen mit Datenbanken. Daher wurde zunächst eine Kopplung aus ultra-hochauflösendem Massenspektrometer (Fourier Transformation Ionen Zyklotron Resonanz Massenspektrometer) und Gaschromatograph entwickelt. Im Anschluss musste sowohl eine funktionierende Methode entwickelt, getestet und evaluiert werden. Da existierende Programme bei der Datenauswertung nur unzureichend oder gar nicht mit den kombinierten chromatographischen und hoch aufgelösten Massenspektren zurechtkamen, wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, verschiedene existierende Ansätze gewinnbringend zu kombinieren. Dabei fiel auf, dass das Evaluieren der Daten ein entscheidender und zeitaufwendiger Faktor ist. Daher wurde im Rahmen der Verbesserung der Datenauswertung, eine automatisierte Methode zur -evaluierung entwickelt. Zum Testen des Systems, einschließlich der entwickelten Datenauswertung, wurden verschiedene komplexe Proben, z.B. Diesel, Schweröl, Bitumen, Verbrennungsaerosole und Drogenmischungen untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Methode die ausgewählten Proben auf molekularer Ebene adäquat beschreiben und bei fragmentierungsarmer Ionisierung gleichzeitig ein weites Spektrum an Substanzen ionisieren kann. Zusätzlich vermag die Kopplung isobare und isomere Verbindungen aus komplexen Gemischen voneinander zu trennen und diese sogar teilweise zu identifizieren, was die Charakterisierung der Proben verbessert.

Summary

The analysis of complex samples with thousands of compounds is an analytical challenge that needed powerful techniques. Mass spectrometry and especially high-resolution mass spectrometry meets that requirements and contributed to the characterization of samples on a molecular level on many research areas. Despite of a more simple and faster sample injection, the hyphenation of a mass spectrometer to chromatographic techniques has some advantages for the separation and identification of unknown substances, for instance the separation of isomeric species or the match of elution times and other molecular information with databases. Therefore, the hyphenation of an ultra-high resolution mass spectrometer (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer) and a conventional gas chromatograph as well as a feasible method for sample analysis were developed. After testing and evaluating there still was a problem with the data analysis. Available software could not handle the combined chromatographic and high resolution mass spectrometric information or was not capable to fulfill all requirements. That is why, a new data analysis algorithm was developed, which combined desired features. Thereby it was approved, that data evaluation is one of the most important and time-consuming factors within the data analysis process. First of all, data analysis by the development of an automatic evaluation of chromatographic data was improved. For testing the approach complex samples from different fields, such as fossil fuel, bitumen, aerosols and drug mixtures, are used. It revealed, that the applied technique provided low fragmentation and ionization of a wide range of substances, which enabled the specification of the selected samples on a molecular level. In addition, the approach provided the separation of isomeric species and their selected identification, so improved the characterization of samples.

Inhaltsverzeichnis

1.	Zielstellung	1
2.	Einleitung und Motivation	2
2.1	Grundlagen Gaschromatographie	3
2.2	Schnittstelle Gaschromatographie und Massenspektrometrie – Ionenquelle ..	7
2.3	Analysatoren & Detektoren	13
2.4	Analysemethoden	20
2.5	Stand der Technik	21
3.	Ergebnisse.....	23
3.1	Apparatur und Entwicklung einer GC-APCI-FTICR-MS Methode	23
3.2	GC-APCI/MS bei Trägergasgeschwindigkeiten deutlich über dem Optimum	24
3.3	Charakterisierung von Metaboliten und Substanzen im Spurenbereich bei der Herstellung von Heroin.....	30
3.4	Entwicklung und Validierung der Programm-gesteuerten Datenauswertung	34
3.5	Anwendung der GC-FT-ICR-MS zur Analyse von Bitumenalterung	37
4.	Vor- und Nachteile der GC-APCI-FTICRMS Methode	41
5.	Zusammenfassung und Ausblick	43
6.	Literaturverzeichnis	44
7.	Anhang.....	56
8.	Veröffentlichungen	63

1. Zielstellung

Die Zielstellung bestand in der Entwicklung einer funktionierenden Kopplung zwischen dem Fourier Transformation Ionen Zyklotron Resonanz Massenspektrometer (FT-ICR-MS) und einem konventionellen Gaschromatographen (GC) zur umfangreicheren Charakterisierung flüchtiger bis mittel-flüchtiger Substanzen in komplexen Gemischen. Dazu musste nicht nur die physische Kopplung beider Geräte hergestellt werden, sondern auch einer Datenaufnahme- und Datenauswertungs-Methode für die ultra-hochaufgelösten chromatographischen Daten entwickelt und verbessert werden.

2. Einleitung und Motivation

Seit der Entwicklung der Gaschromatographie ist diese Trenntechnik stetig weiterentwickelt worden und zählt deswegen anhaltend zu einer der leistungsstärksten Trennmethode überhaupt. Dabei basiert sie auf der Verteilung von Analyten zwischen einer stationären und einer mobilen Gasphase. Durch das kontinuierliche Einstellen eines Verteilungsgleichgewichtes zwischen beiden, kommt es zur Auftrennung verschiedenster Analytgemische. Voraussetzung dafür ist, dass die Substanzen sich bei den angewandten Temperaturen zumindest teilweise stabil in die Gasphase überführen lassen. Die Auftrennung des Analytgemisches ist aber von verschiedenen Faktoren abhängig. Zum Beispiel durch die Anzahl der Analyten im Gemisch, deren Polarität, deren chemische Struktur und Systemparametern wie Säulenlänge oder Temperatur (CASTELLO 1999). Dabei kann nicht immer gewährleistet werden, dass alle Substanzen des Gemisches voneinander getrennt werden können. Um mittels Gaschromatographie eine Validierung der detektierbaren Substanzen durchzuführen, muss eine entsprechende Vergleichssubstanz vermessen und deren Retentionszeit bestimmt werden. Das co-eluiere zweier oder mehrere Substanzen, führt dazu dass diese Komponenten nicht oder nur unzureichend aufgetrennt werden und so gleichzeitig aus der chromatographischen Säule gelangen. Dann können die betreffenden Stoffe häufig nicht mehr eindeutig identifiziert werden. Um diesem Problem vorzubeugen, wird die Gaschromatographie mit anderen Trenntechniken gekoppelt. McLafferty erkannte schon in den 1950er Jahren die Vorteile der Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (MCLAFFERTY 1956, 1959). Dadurch konnten zusätzlich zu den Retentions- auch Masseinformationen einer Substanz generiert werden. In Abhängigkeit von der Ionisierung der Analyten können nahezu alle Substanzen, oder selektiv einzelne Substanzklassen, angeregt und detektiert werden. Dabei können die meisten konventionellen Massenspektrometer heutzutage die Massen schon auf eine oder zwei Stellen nach dem Komma bestimmen. Sollen noch genauere Bestimmungen durchgeführt werden, müssen ultra-hochauflösenden Massenspektrometer verwendet werden. Diese erlauben durch Genauigkeiten von unter 1ppm und sehr hohen Massenauflösungen. Sogar die Berechnung von Elementarzusammensetzungen für bestimmte Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z) wird hierdurch ermöglicht. Mittels Kopplung von GC und ultra-hochauflösenden MS können somit unbekannte Substanzen und Stoffgemischen mit sehr großer Substanzanzahl untersucht werden. In jedem Fall muss aber sichergestellt werden, dass die Analytsubstanzen nicht durch die Detektion fragmentiert wer-

den, da ansonsten keine validen Aussagen über die unbekannte Ausgangssubstanz getroffen werden können, oder die Komplexität der Probe unnötigerweise weiter zunehmen würde. Daher wird versucht mit „weicher Ionisierung“ selektive Analyten anzuregen.

Um besser verstehen zu können, was „weiche Ionisierung“ bedeutet und wie die Chromatographie mit der Massenspektrometrie verbunden werden kann, wird im Folgendem kurz auf Grundlagen der Techniken eingegangen.

2.1 Grundlagen Gaschromatographie

Die Gaschromatographie gehört zur Gruppe der Verteilungs- bzw. Adsorptionschromatographien, wobei grundsätzlich die unterschiedliche Wechselwirkung der Einzelkomponenten eines zu trennenden Stoffgemisches mit einer mobilen Phase (hier ein Trägergas) und der stationären Phase ausgenutzt wird. Dabei gilt: je stärker die Wechselwirkung einer Substanz mit der stationären Phase ist, desto länger verweilt sie auf der Trennsäule. Allerdings dürfen die Wechselwirkungen nicht so stark sein, dass eine Substanz irreversibel an der Trennsäule adsorbiert. Zu schwache Wechselwirkungen hingegen können sich bei der Auftrennung mehrere Substanzen ebenso negativ auswirken. Daher müssen sowohl die stationäre als auch die mobile Phase gut auf das relevante Trennproblem abgestimmt sein.

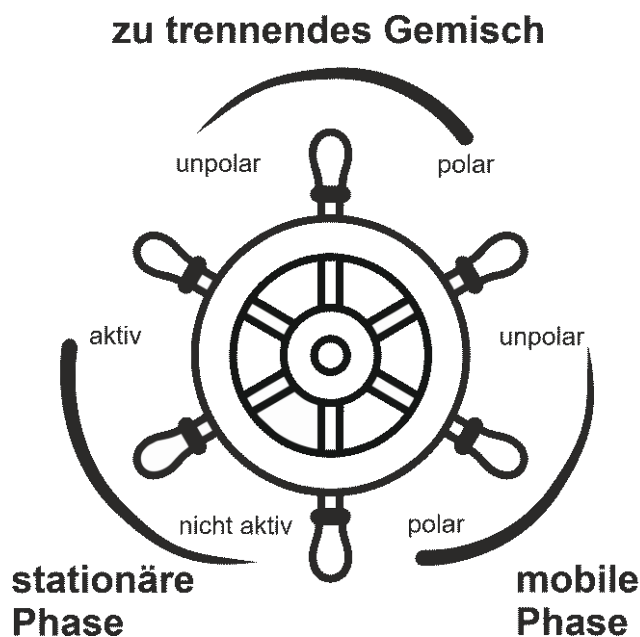


Abbildung 1 Chromatographisches Dreieck

Die Polarität der stationären Phase wird meist über Variationen der Endgruppen und der Vernetzung der Polyorganosiloxan Schicht, im Inneren der Trennsäule, eingestellt. Der Aufbau der Trennsäulen hat sich dabei im Laufe der Jahrzehnte deutlich weiterentwickelt. Beginn man Anfang der 50er Jahre (JAMES AND MARTIN 1952), zu Beginn des Zeitalters der

Gaschromatographie, noch mit gepackten Säulen mit Aktivkohle, wurden schon wenig später sogenannte Kapillarsäulen entwickelt, die die Trennleistung um den Faktor 100 bis 1000 verbesserten. Auch diese wurden im Laufe der Zeit verbessert, sodass es mittlerweile viele Varianten derer gibt. Die wichtigsten sind die „Schichtkapillarsäule“ (PLOT), die „trägerbeschichteten“ Kapillarsäulen (SCOT), die „Dünnschicht“ Kapillarsäulen (WCOT) und die FSOT-Säulen, die sich nur durch eine aus Quarzglas mit Polyimid beschichtete Säulenwandung von den WCOT-Säulen unterscheiden. Eine Übersicht über die wichtigsten, herkömmlichen Säulen und deren Zusammensetzung der Trennsäulenbeschichtung ist im Anhang gegeben. Im Gegensatz dazu ist die Polarität der mobilen Phase, oder des Trägergases, nur bedingt einstellbar. Es gibt zwar eine Vielzahl von Gasen, die verwendet werden könnten, aber auf Grund der analytischen Anforderungen an Reinheit und Volumenstrom reduziert sich deren Anzahl auf eine überschaubare Menge. Diese besitzen in der Regel eine geringe Polarität.

Tabelle 1 häufig eingesetzte Trägergase in der Gaschromatographie

Trägergas	Formelzeichen
Argon	Ar
Argon + 5 % Methan	Ar + 5 % CH ₄
Helium	He
Kohlenstoffdioxid	CO ₂
Stickstoff	N ₂
Wasserstoff	H ₂

Die mögliche Verwendung einzelner Gase richtet sich zudem nach dem zu verwendenden Detektor. Die Vielfalt derer ist groß. Eine Übersicht über die wesentlichen Alternativen wird unter Kapitel 2.3 „Analysatoren und Detektoren“ aufgeführt. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass nicht jeder Detektor mit jedem Trägergas kombiniert werden kann. Durch Eingabe mittels Injektors wird die zuletzt gasförmige Probe auf die Trennsäule eingebracht. Die am häufigsten eingesetzten Injektoren lassen sich dabei in vier Varianten aufteilen:

1. Split/Splitless-Injektoren
2. On-Column-Injektoren
3. Kaltaufgabe-Injektoren
4. Direktaufgabesysteme mittels Ventilschaltung

Bei der ersten Variante wird die Probe über eine Membran in einen konstant beheizten Injektor gebracht und dort verdampft. Dabei strömt zusätzlich Trägergas mit konstanter Fließgeschwindigkeit in den Injektor und vermischt sich mit der Probe. Der Gasstrom aus beidem wird anschließend entsprechend der Einstellungen aufgeteilt. Denn durch das Einstellen des Gesamtflusses in den Injektor und die Regelung der Durchflussmenge über den Splitausgang kann festgelegt werden, welcher Volumenstrom auf die Trennsäule gelangt.

Beim On-Column-Injektor hingegen, wird die Probe direkt in die nicht beheizte Säule injiziert. Dabei wird die Probe vollständig auf die Trennsäule aufgebracht. Das Verfahren eignet sich daher besonders für sehr niedrig konzentrierte Analyten. Es muss aber darauf geachtet werden, dass die Probe komplett verdampft wird, da ansonsten Rückstände auf der Säule verbleiben, die nachfolgende Untersuchungen stören können.

Das Kaltaufgabesystem wiederum ermöglicht es den Benutzern, im Injektor ein vom Gaschromatographen unabhängiges Temperaturprogramm zu realisieren. Im Unterschied zu den vorherigen Injektor-Typen können durch den Einsatz eines Zusatzmoduls auch Feststoffproben in den GC eingebracht werden. Ansonsten ähnelt das Kaltaufgabesystem in seinen Funktionen dem Split/Splitless-Injektor.

Die letztgenannte Variante der Direktaufgabe findet eher selten Anwendung und erklärt sich dem Namen nach größtenteils selbst. Dabei wird per automatischer Ventilschaltung eine Probe entweder auf die Säule oder zu anderen Ausgängen geleitet.

Ist die Probe injiziert, werden auf der Trennsäule ihre Bestandteile anhand ihrer Dampfdrücke und Polaritäten voneinander getrennt. Abhängig von der Polarität der stationären Phase und des Analyten kommt es während des Transportes der Moleküle durch die Trennsäule zu mehrfacher Adsorption und Desorption. Je stärker die Wechselwirkungen sind, desto stärker wird auch der Analyt an die stationäre Phase gebunden. In diesem Fall benötigt der Analyt mehr Zeit um die Trennsäule zu durchlaufen, was bedeutet, dass die Retentionszeit zunimmt. Dabei stellen sich für jede Substanz stetig neue Gleichgewichte für die Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase ein. Diese Gleichgewichte können mit dem RAOULTschen Gesetz beschrieben werden, wonach der Partialdruck (p_i) einer Substanz in der mobilen Phase sich aus dem Produkt von Stoffmengenanteil (χ_i) der Komponente und dessen Dampfdruck (p_i^0) in der Reinform errechnet.

$$p_i = \chi_i p_i^0 \quad (2.1)$$

Formel 1 Raoult'sches Gesetz

Die genaue Stärke der Wechselwirkung hängt dabei von mehreren Faktoren, z.B. der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, von Van-der-Waals-Bindungen oder Donor-Akzeptor-Bindungen, ab.

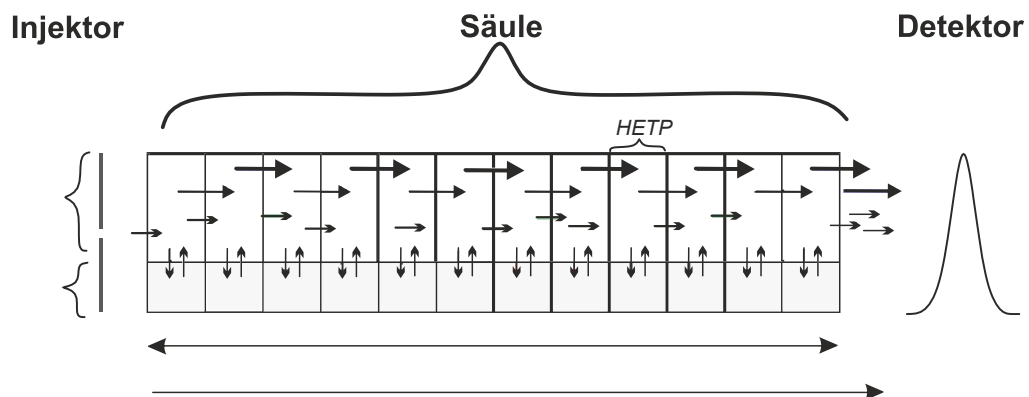


Abbildung 2 Chromatographisches Trennprinzip

Die Anzahl der möglichen Einstellungen chemischer Gleichgewichte lässt sich auch als Länge ausdrücken, die als theoretische Bodenhöhe (HETP) oder Trennstufenhöhe bezeichnet wird. Diese gibt Auskunft über die chromatographische Trennleistung einer Säule. Unter der Annahme, dass die Temperatur und Fließgeschwindigkeit konstant sind und die stationäre Phase nicht überladen wird, lässt sich die Trennstufenhöhe (H) mit Hilfe der Van-Deemter-Gleichung (VAN DEEMTER ET AL., 1956) ermitteln.

$$H = A + \frac{B}{u_x} + C * u_x \quad (2.2)$$

Formel 2 Van-Deemter-Gleichung

Hierbei steht der Term „A“ für die Eddy-Diffusion, die prinzipiell durch unterschiedliche Fließstrecken der Teilchen durch die Säule charakterisiert ist. Aufgrund ihres Aufbaus entfällt dieser Term sinnvoller Weise für Kapillarsäulen. Der zweite Term „ B / u_x “ beschreibt die longitudinale Diffusion, das bedeutet die Diffusion entlang der Achse der Fließrichtung. Die Besonderheit hier ist, dass die lineare Fließgeschwindigkeit (u_x), zum ersten Mal mit einer Rolle spielt. Sie bewirkt, dass der Term mit steigender Fließgeschwindigkeit immer kleiner wird. Entgegengesetzt verhält es sich mit dem letzten Term $C * u_x$. In der Variablen C wird die Zeit, die für die Einstellung eines chemischen Gleichgewichtes zwischen mobiler und stationärer Phase benötigt wird, mitberücksichtigt. Je höher die angewandte Fließgeschwindigkeit ist, desto weniger Zeit bleibt der Substanz für die Einstellung des Gleichgewichtes. Das beinhaltet, dass die Einstellzeit für das Gleichgewicht einer Substanz, bei höherer Fließgeschwindigkeit mehr Zeit bzw. eine größere Trennstufenhöhe benötigt.

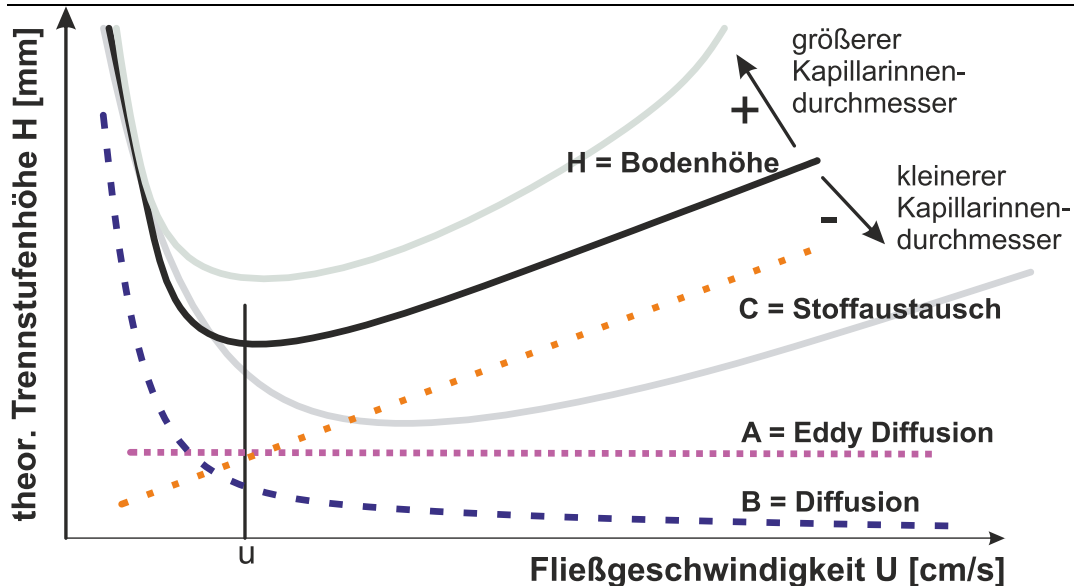


Abbildung 3 Van-Deemter-Graph zur Bestimmung der Trennstufenhöhe mit Darstellung des Einflusses des Kapillarinneendurchmessers

Anhand der Summe der drei Terme kann eine resultierende Bodenhöhe in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit berechnet werden (Vgl. Abbildung 3). Wie in Abbildung 3 dargestellt, weist der resultierende Graph ein Minimum aus, bei dem die Trennstufenhöhe folgerichtig minimal ist. Das bedeutet, dass bei dieser Fließgeschwindigkeit die beste Trennleistung der Säule gegeben ist. Werden die Säulenparameter verändert, so hat das einen direkten Einfluss auf die Lage des Minimums.

Wird die Gaschromatographie in Kombination mit einem Massenspektrometer als Detektor verwendet, so fungiert der GC zudem als Einlasssystem. Diese klassische Kombination hat sich als hervorragende Technik für die Analyse komplexer Probenmatrizen ausgezeichnet.

2.2 Schnittstelle Gaschromatographie und Massenspektrometrie – Ionenquelle

Um aber eine gaschromatographische Trennung mit einem Massenspektrometer zu koppeln, muss eine Schnittstelle, die Ionisierungsquelle, verwendet werden. Wie in Kapitel 2.1 gezeigt, trennt die GC Substanzgemische bestenfalls in ihre Einzelkomponenten auf. Um diese aber mit einem Massenspektrometer detektieren zu können, müssen diese zuvor möglichst vollständig ionisiert werden. Genauer dazu folgt in Kapitel 2.3, aber zusammengefasst leitet, separiert und detektiert die MS die Analyten durch elektromagnetische Felder. Die Ionisierung erfolgt in der Ionenquelle. Die Art und Weise derer ist vielfältig. Grundsätzlich können aber zwei Hauptarten unterschieden werden. Die sogenannte „harte“ Ionisierung, bei der auf die zu ionisierenden Moleküle deutlich mehr Energie übertragen wird, als für eine Ionisierung notwendig ist. Dabei können Moleküle unabhängig von ihrer umgebenden Matrix

ionisiert werden. Durch den hohen Energieeintrag ist aber meist eine Fragmentierung zu beobachten. Das kann, wie im Fall der Elektronenstoßionisierung (EI), durchaus nützlich sein. Durch zahlreiche Untersuchungen wurden für tausende Einzelsubstanzen charakteristische Fragmentspektren generiert und in Datenbanken archiviert. Durch Vergleichen der Datenbankeintragen mit spezifischen Untersuchungsergebnissen ist es im Umkehrschluss möglich, Substanzen anhand ihres Fragmentierungsmusters zu identifizieren. Zusätzlich ermöglicht die Fragmentierung den Zugang zu strukturellen Informationen. Als weitere „harte“ Ionisierung wäre z.B. die Ionisierung über ein induktiv gekoppeltes Plasma zu nennen. Da hierbei aber die Moleküle meist in ihre Elemente aufgebrochen werden, geht die molekulare Information verloren, weshalb die Methode meist für anorganische Spuren- und Elementaranalytik genutzt wird.

Die andere Art der Ionisierung wird als „weiche“ Ionisierung bezeichnet, da hierbei vergleichsweise wenig Energie auf die Analytmoleküle übertragen wird. In den meisten Fällen liegt diese nur geringfügig über der Ionisierungsenergie oder sogar darunter. Dadurch sind die „weichen“ Ionisierungsarten in der Lage, Substanzen innerhalb von Gemischen selektiv zu ionisieren und kleine Lösungsmittel- oder Gasmoleküle, welche meist in sehr hohen Konzentrationen vorhanden sind, können vernachlässigt werden. Diese Vorgehensweise schont die Gerätebauteile und erleichtert die Datenauswertung. Zudem ist dies ein Vorteil bei der Analyse und Strukturaufklärung von Substanzen in komplexen Matrices. Durch Fragmentierung anderer Substanzen könnten relevante Masse-zu-Ladungsverhältnisse überdeckt werden. Für unbekannte Substanzen ohne zusätzliche Informationen bietet sich auch nicht der Vergleich eines Fragmentierungsspektrum mit einer Datenbank an, da nicht sicher festgestellt werden kann welche Signale durch den Analyten verursacht werden.

Die Selektivität kann aber auch nachteilig sein, da die Ionisierung von der Probenmatrix und ggf. der Ionenquellenatmosphäre abhängig ist. Somit ist ein Vergleich von Untersuchungsergebnissen zwischen verschiedenen Ionisierungsarten nur sehr schwer bis unmöglich (GASPAR ET AL. 2012). Sogar der Vergleich zwischen gleichen Ionenquellen kann deutliche Abweichungen in den Intensitäten der Analytspezies aufweisen (WACHSMUTH ET AL. 2015). Dies ist nicht zuletzt ein Grund dafür, dass bisher keine öffentlichen Datenbanken zu Vergleichsspektren, gewonnen mittels „weicher“ Ionisierung, verfügbar sind.

Im folgenden Teil werden einige der „weichen“ Ionisierungsarten näher vorgestellt, da diese für die vorliegende Arbeit grundlegend sind. Begonnen wird mit der chemischen Ionisierung (CI). Grundsätzlich findet diese, ebenso wie die EI, in einer evakuierten Ionenquelle statt, um Stöße der ionisierten Teilchen mit anderen Molekülen/Ionen zu minimieren. In beiden

Fällen werden Moleküle durch Elektronenstoßionisierung angeregt. Der Unterschied zwischen CI und EI besteht allerdings in der Art der angeregten Teilchen. Während die mittels EI generierten Analytmoleküle direkt ionisiert werden, wird bei der CI zunächst ein Reaktionsgas angeregt. Welches verwendet wird, hängt dabei von den Analyten ab, die untersucht werden sollen. Eine Liste der am häufigsten verwendeten Reaktionsgase ist im Anhang aufgeführt. Das Reaktionsgas ist im deutlichen Überschuss vorhanden und wird somit vorwiegend ionisiert. Die entstehenden Reaktand-Ionen übernehmen dann die Rolle des Ladungs-/Protonenvermittlers und übertragen durch Stöße ihre Ladung an andere Moleküle, vorausgesetzt deren Reaktionsenergie (Protonenaffinität oder Ionisierungsenergie) ist niedriger als die des Reaktionsgases.

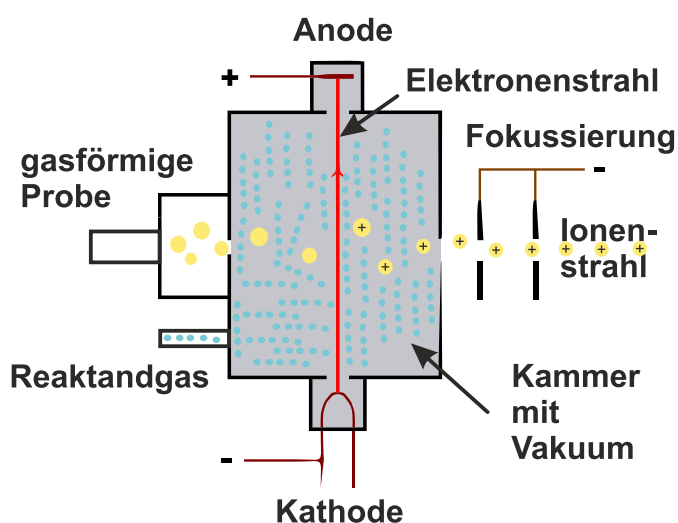


Abbildung 4 Schema der chemischen Ionisierung

Der Reaktionsmechanismus der chemischen Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) ähnelt dem der chemischen Ionisierung. Wie der Name schon verrät, besteht allerdings der wesentliche Unterschied, in der Ionenquelle, die unter Atmosphärendruck betrieben wird. Dazu wird ein Reaktionsgas, zumeist Stickstoff (N_2), mit großem Volumenstrom in die Quelle eingebracht. Da bei Atmosphärendruckquellen das Vorhandensein von Wasser nie völlig ausgeschlossen werden kann, muss demzufolge bei dem Ionisierungsmechanismus neben dem eigentlichen Reaktionsgas noch ein weiterer Reaktand, nämlich Wasser, mitberücksichtigt werden. Durch den höheren Druck in der Quelle wird zudem die Ionisierung nicht wie bei CI üblich durch einen mittels Glühkathode emittierten Elektronenstrahl realisiert, sondern über die Entladung an einer Koronanadel.

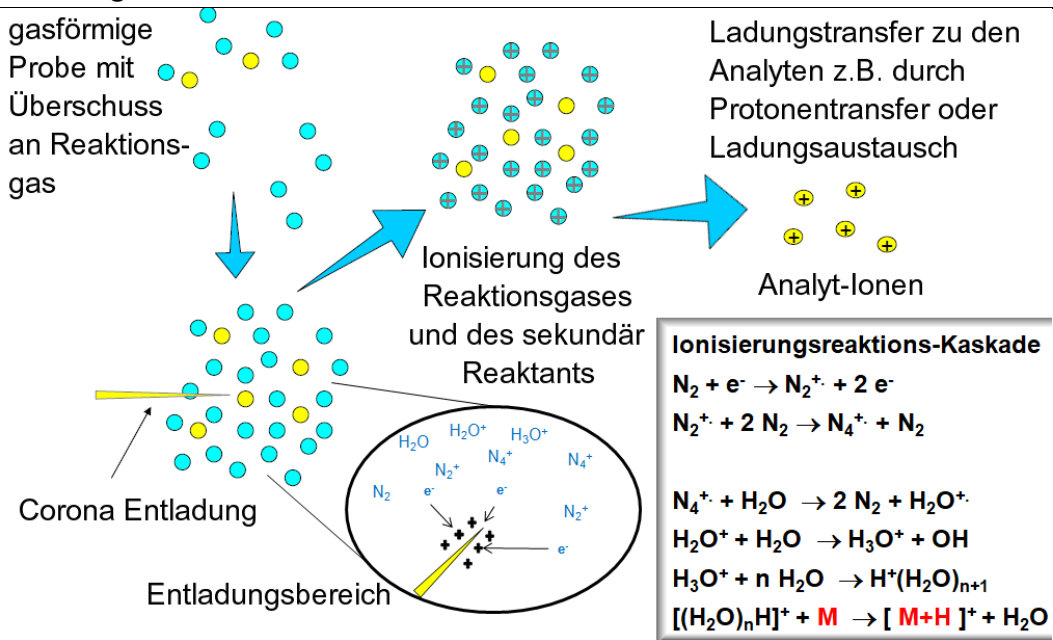


Abbildung 5 schematische Darstellung der APCI

Die Bildung von Artefakten durch die Ionisierung kann an dieser Stelle nicht völlig ausgeschlossen werden (AMUNDSON ET AL. 2012; DAVID ET AL. 2013). Daneben ist sie zusätzlich abhängig von der Polarität der Ionisierung. Im Allgemeinen werden bei negativer weniger Artefakte beobachtet als bei positiver Ionisierung. Eine Übersicht über die bedeutendsten Reaktionsmechanismen (HORNING ET AL. 1973; MCEWEN AND LARSEN 2009; PORTOLÉS ET AL. 2010) liefert die folgende Abbildung.

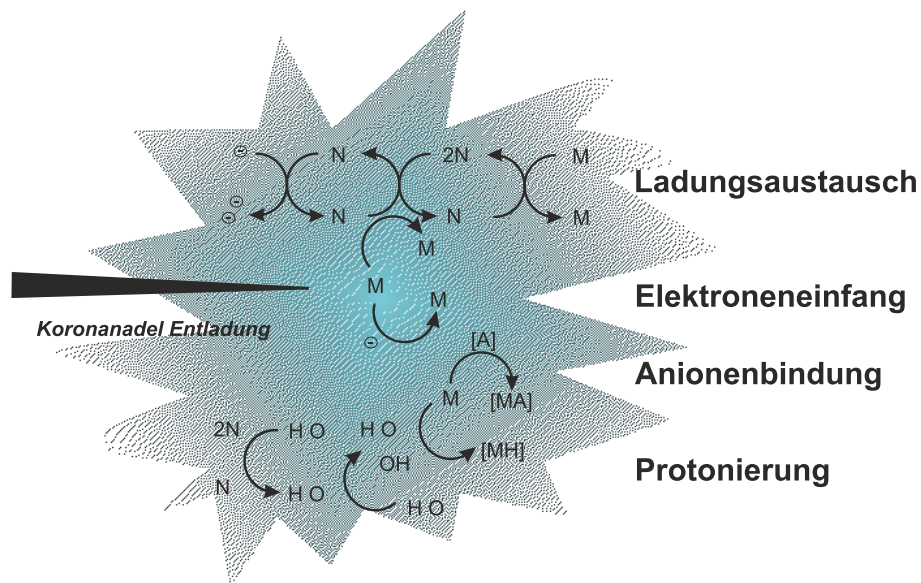


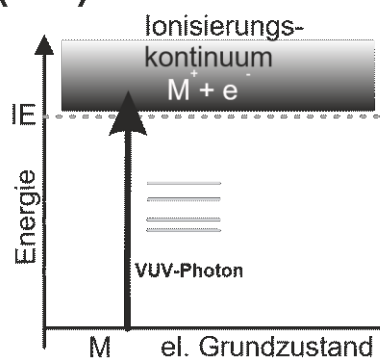
Abbildung 6 bedeutendste Reaktionsmechanismen in der APCI

Vor allem durch das Vorhandensein von Wasser können Addukte der Analytmoleküle gebildet werden. Dies kann vor allem bei der Charakterisierung von Alterungs- und Oxidationsprodukten zu Schwierigkeiten innerhalb der Unterscheidung zwischen Addukten und realen Alterungsprodukten führen. Aus dieser Problematik resultierten in der Folgezeit zahlreiche Weiterentwicklungen in Konzeption und Aufbau von Ionenquellen (SCHIEWEK ET AL. 2008)

Bei der Elektrospray-Ionisierung (ESI) werden auf Grund des Reaktionsmechanismus hauptsächlich geladene oder polare Substanzen ionisiert. Da die Substanzen bei dieser Technik nicht verdampft werden, können Moleküle deutlich höherer Massen, wie z.B. Proteine, ionisiert werden. Dabei wird die flüssige Probe direkt über eine metallische Kapillare in die Quelle eingebracht. Die Ladung der Analyten erfolgt über chemische Zusätze und elektrische Felder zwischen Kapillare und Gegenelektrode. Die gebildeten Tropfen werden auf dem Weg zum Massenanalysator immer kleiner, indem die Lösungsmittel immer weiter abdampfen. Gleichzeitig treten „Tropfenexplosionen“, induziert durch Columb'sche Abstoßung auf, wobei auf den Analytmolekülen, in Abhängigkeit von der Größe der Moleküle, mehrere Ladungen verbleiben können. So sind bei größeren Analyten häufig sogar Ladungsverteilungsmuster zu beobachten.

Bei der zuletzt zu nennenden Photoionisierung werden meist einfach geladene Analytionen gebildet. Die Moleküle absorbieren elektromagnetische Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge. Diese Absorption eines oder mehrerer Photonen führt zum Anheben der Energie der Moleküle bis hin zum Überschreiten der Ionisierungsenergie. Die Ionisierung mittels eines Photons wird als Ein-Photon-Ionisierung (single photon ionization – SPI) bezeichnet. Erfolgt die Ionisierung über mehrere Stufen (d.h. mehrere Photonen), wird dies als Mehr-Photonen-Ionisierung bezeichnet. Eine der bekanntesten Varianten ist die Resonanzverstärkte Mehrphotonenionisierung (REMPI).

Ein-Photon-Ionisierung (SPI)



Mehr-Photonen-Ionisierung (REMPI)

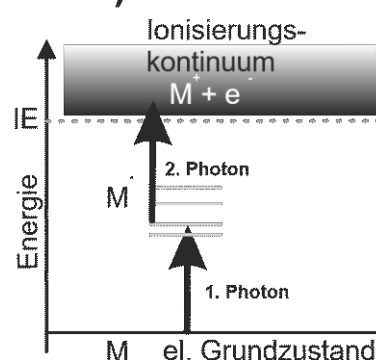


Abbildung 7 Schema Photoionisierung (Adaptierte Darstellung von (Dorfner et al. 2004))

Vergleicht man die beschriebenen Ionisierungsvarianten bezüglich der Ionisierungsfähigkeit von Substanzen unterschiedlicher Größe und Polarität miteinander, so erhält man folgendes Bild.

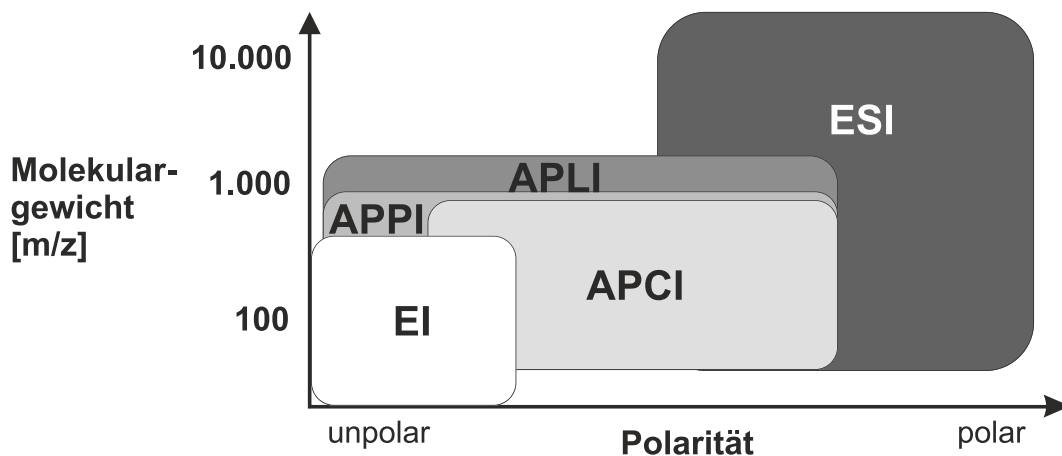


Abbildung 8 Atmosphärendruck Ionisierungstechniken im Vergleich (angepasste Darstellung von Li et al. 2015)

Die beiden Photoionisierungsvarianten, Laserionisierung (APLI) und Photoionisierung unter Atmosphärendruck (APPI), sind in der Lage, ähnlich wie die Elektronenstoßionisierung auch, unpolare Substanzen, wie z.B. Alkane, zu ionisieren. APCI zeigt einen etwas geringeren Anwendungsbereich als APPI und APLI, kann aber für einige Substanzen höhere Ionisierungseffizienzen aufweisen (HERRERA ET AL. 2008; ZIMMERMANN 2013). Deutlich polarere Substanzen höheren Molekulargewichtes lassen sich vorrangig mittels ESI ionisieren.

Neben der Einteilung in „hart“ und „weich“ können die Ionisierungsvarianten auch in kontinuierliche und diskontinuierliche Anregung unterteilt werden, wobei bei ersterer Variante permanent Ionen gebildet werden, wohingegen und dies bei letzterer pulsartig erfolgt.

Alle diese Zusammenhänge sollten vor allem bei der Zielstellung der Analyse mit berücksichtigt werden, da nicht alle Kombinationen von verschiedenen Ionenquellen und Detektoren (Massenspektrometern) optimale Ergebnisse liefern.

Kurz zusammengefasst, regen „harte“ Ionisierungsarten die Substanzmoleküle weitgehend unabhängig von ihrer chemischen Umgebung an, erzeugen aber dabei, meist reproduzierbar, eine starke Fragmentierung. „Weiche“ Ionisierungsvarianten weisen häufig eine deutlich niedrigere Fragmentierung auf, was vor allem im Hinblick auf die Identifizierung unbekannter Substanzen in komplexen Matrices von Vorteil ist. Durch die Varianten der „weichen“, selektiven Ionisierung wird in der Regel nur ein Teil der Substanzen der Probe ionisiert, wobei in Abhängigkeit von der gewählten zudem die Ionisierungseffizienz für Substanzen variieren kann. Deshalb ist es wichtig, je nach Fragestellung der Analyse abzuwägen, welche Form der Ionisierung am vielversprechendsten ist.

2.3 Analysatoren & Detektoren

Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um ein physikalisches Verfahren zur Trennung von Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z). Dabei charakterisieren die Massenauflösung (R), die Massengenauigkeit, der Massenbereich sowie der lineare dynamische Bereich und die Messrate im Wesentlichen die Leistungsfähigkeit der Massenspektrometrie (MANN AND KELLEHER 2008; SCIGELOVA ET AL. 2011; TRETYAKOVA ET AL. 2012). Die Massenauflösung wird meistens nach folgender Formel berechnet:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (2.3)$$

Formel 3 Massenauflösung

Hierbei wird zur Bestimmung der Massenauflösung bei einer bestimmten Masse (m), diese Masse durch den Abstand zu der nächstliegenden Masse (Δm) geteilt. Dabei kann der Abstand sowohl bei 10 % als auch bei 50 % der Peakhöhe ermittelt werden.

Die Massengenauigkeit gibt weiterhin an, wie exakt die Masse eines Ions bestimmt werden kann. Durch die hohe Genauigkeit findet die Massenspektrometrie häufig Einsatz in der Molekülanalytik, denn sie kann Aufschluss über die Elementzusammensetzung und teilweise auch über die Struktur eines Moleküls geben. Mittels Massenspektrometrie können Substanzen über einen weiten dynamischen Bereich von 5 bis zu 300000 Da detektiert werden (CAMMANN 2001).

Das Kernstück eines jeden Massenspektrometers bilden der Analysator und Detektor bzw. eine Kombination aus beidem. In den meisten Massenspektrometern sind Analysatoren, verantwortlich für die Auftrennung der ionisierten Teilchen nach ihrem m/z -Verhältnis und Detektoren baulich voneinander getrennt. Die Anforderungen an die Analysatoren sind zahlreich. Um nur einige zu nennen: Massenbereich, Auflösung, Scanrate. Einen guten Überblick über entsprechende Merkmale liefert Brunneé in seiner Arbeit (BRUNNÉE 1987) über den idealen Massenanalysator. Natürlich haben sich seitdem viele der Analysatoren neu- oder weiterentwickelt worden., Trotzdem sind natürlich viele der Anforderungen aktuell noch bis heute gültig. Generell werden die Analysatoren in die folgenden vier großen Gruppen eingeteilt.

1. *Quadrupole und Triplequadrupole*

Bei diesen Analysatoren erfolgt die Auftrennung bzw. Speicherung des Ionenstrahls in einem linearen Radiofrequenz-Quadrupolfeld mittels Resonanzanregung der Ionen und Instabilität der Ionentrajektorien. Dazu werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und durch einen Quadrupol mit angelegter Wechselspannung geleitet. Die

Wechselspannung bewirkt eine instabile Bahn der Ionen, bei der nur bestimmte von ihnen den Quadrupol ungehindert passieren.

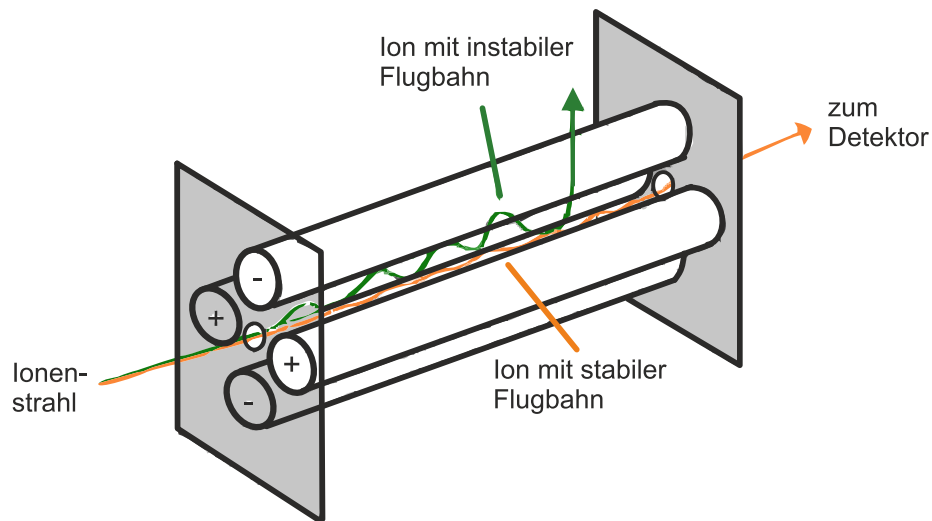


Abbildung 9 schematische Darstellung eines Quadrupols adaptierte Darstellung von (Skoog et al. 2007)

2. Flugzeit

Bei den Flugzeit Massenspektrometern (TOF-MS) wird eine Auftrennung der Teilchen des gepulsten Ionenstrahls anhand der Flugzeit erreicht. Auch hier werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt. Allerdings erfolgt die Auftrennung der Ionen in einem feldfreien Raum. Da für die Teilchen sowohl die Ladung (z) als auch die Beschleunigungsspannung (U) bekannt ist, kann mit Hilfe der Flugzeit (t) die Masse berechnet werden.

$$\frac{m}{z} = \frac{2 e U t^2}{s^2} \quad (2.4)$$

Formel 4 Berechnung des m/z -Verhältnisses für TOF-MS

Die Strecke (s), die die Ionen zurücklegen müssen kann je nach Gerät variieren. Auch gibt es unterschiedliche Konstruktionsvarianten, die individuelle Vor- und Nachteile haben. Um die Gleichung exakt lösen zu können, müssen aber neben der Elementarladung (e) noch weitere Terme mit einbezogen werden (z.B. Laserpulsbreite oder Beschleunigungszeit der Ionen) (GUILHAUS 1995).

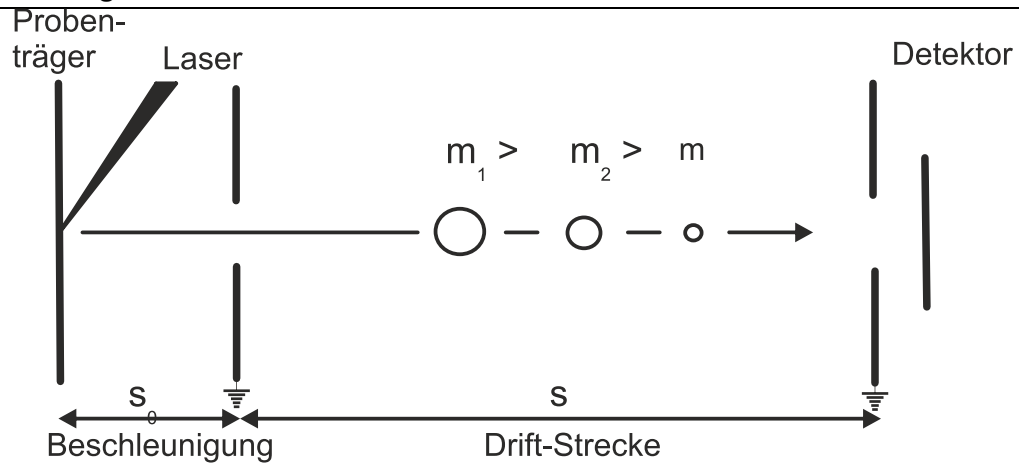


Abbildung 10 Schema TOF-MS

Allgemein gilt, dass je länger die Flugstrecke der Ionen ist, desto höher ist auch die mögliche Massenauflösung. Da aber bei längeren Flugstrecken die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit der Teilchen untereinander und mit äußeren Feldern größer ist, sinkt meist die Intensität der Ionensignale.

Im Gegensatz zu den anderen Analysortypen diskriminieren TOF jedoch nicht einzelne Ionen, sondern bestimmen simultan die Flugzeiten aller Teilchen. So kann im Vergleich zu den anderen Systemen eine extrem hohe Anzahl von Massenspektren pro Sekunde aufgenommen werden.

3. Sektorfeld

Hier wird der Ionenstrahl mittels elektrischer und magnetischer Felder gelenkt, fokussiert und aufgetrennt. Die verschiedenen m/z -Verhältnisse beschreiben dabei Bahnen unterschiedlicher Radien im Sektorfeld MS. Die genauen Radien werden dann durch die aufgenommene Energie im elektrischen Feld und durch den Impuls im magnetischen Feld beeinflusst. Sind die genauen Größen der Variablen und die Ladung des Ions bekannt, kann anhand des spezifischen Radius' die Masse bestimmt werden.

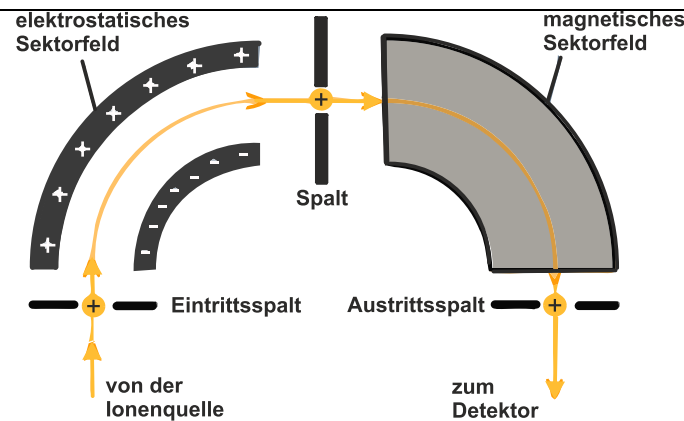


Abbildung 11 Schema doppelfokussierendes Sektorfeld MS

4. Ionenfallen

Bei den Ionenfallen werden Ionen durch elektromagnetische Wechselfelder gefiltert und gespeichert. Deren Entwicklung ist vor allem in den letzten Jahren enorm vorangeschritten (Quadrupol- und lineare Fallen, Fourier Transformations-MS (FT-ICR und Orbitrap). Dabei stehen vor allem die Massenauflösung, Massengenauigkeit, dynamischer Bereich, Massenbereich und Acquisitionsgeschwindigkeit maßgeblich für die wichtigsten Charakteristika der Massenspektrometer. Vor allem die Weiterentwicklung der FT-MS Geräte brachten Instrumente mit extrem hohen Massenauflösungen und -genauigkeit hervor (JONATHAN 1996, MARSHALL 2000, GROSS 2013). Speziell die Fourier Transformation Ionen Zyklotron Resonanz MS Geräte z.B. gehören heute zu den Massenspektrometern mit der höchsten Massenauflösung und -genauigkeit. Dabei sind Massenauflösungen jenseits der 20.000.000 für kleine Massenbereiche möglich (BRUKER DALTONICS 2017).

Die Bestimmung der m/z -Verhältnisse erfolgt über die Messung zugehöriger Zyklotronfrequenzen der Ionen in einem statischen magnetischen (FT-ICR) oder elektromagnetischen Feld (Orbitrap) (MARSHALL 1998, MAKAROV 2000). Alan G. Marshall und Melvin B Comisarow erkannten in den 1970er Jahren als erstes, wie die Ionen Zyklotron Resonanz Technologie mit der Fourier Transformation kombinierbar ist und entwickelten das erste FT-ICRMS Instrument (SMITH 1951, SOMMER 1951, BALDESCHWIELER 1968, COMISAROW 1974, 1974(2)). Das zugrunde liegende Prinzip wurde aber schon vorher von Ernest Lawrence in den 1930er Jahren beschrieben (LAWRENCE 1932). Bei der ICR-Technik werden geladenen Teilchen in ein homogenes magnetisches Feld eingebracht und dort so angeregt, dass sie Kreisbahnen beschreiben. Die positiv geladenen Ionen bewegen sich dabei in die entgegengesetzte Richtung wie negativ ionisierte Teilchen (Formel 2.5). Da die resultierende Frequenzen mit extrem hoher Genauigkeit gemessen und in Massenspektren transformiert werden können, zählen diese Instrumente zu den Geräten mit der höchsten Massenauflösung und Massengenauigkeit.

Genau genommen besitzen fast alle FT-ICR-MS eine Kombination aus mehreren Analysatoren, da in der Regel eine Filterung bzw. Leitung der Ionen mit Hilfe von z.B. Quadrupolen und/oder Hexapolen vor der FT-ICR-Zelle durchgeführt wird. In der eigentlichen Zelle, die „nur“ eine Mehrelektronen-Ionenfalle ist, werden nach dem Einschleusen der Ionen auf die zentrale Längsachse, diese durch Hochfrequenzradiopulse (RF) angeregt größere Bahnradien zu beschreiben. Die eingebrachten RF-impulse übertragen dabei ein hohes Maß an Energie auf die Ionenpakete im Inneren der Zelle (SCHWEIKHARD et al. 1993).

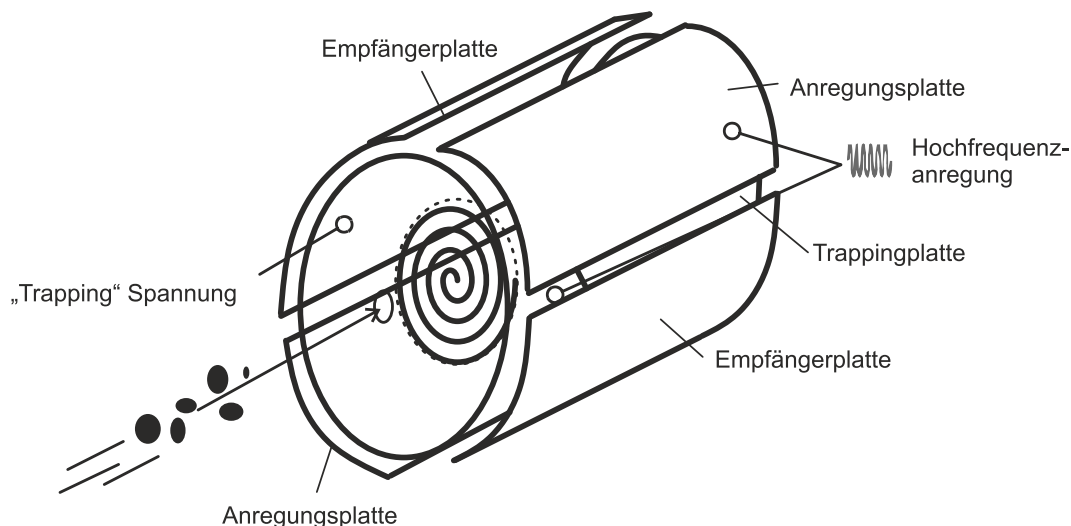


Abbildung 12 schematische Darstellung der FT-ICR-Zelle mit Anregung der Ionen

Durch das starke, homogene, äußere Magnetfeld werden die Ionen durch die Lorentzkraft auf Kreisbahnen gezwungen. Damit die Ionen sich auf stabilen Bahnen bewegen können, muss die Lorentzkraft im Gleichgewicht mit der Zentripetalkraft sein. Mit Hilfe der folgenden Gleichung kann dann aus der Zyklotronfrequenz (f_c), der Magnetfeldstärke (B) das m/z -Verhältnis errechnet werden.

$$f_c = \frac{\omega_c}{2\pi} = \frac{B \cdot q}{m} \quad (2.5)$$

Formel 5 Berechnung des m/z -Verhältnisses für FT-ICR Analysatoren

Die zirkulierenden Ionenpakete induzieren nun an den Empfänger Elektroden ein Bildstrom, der über die Zeit aufgezeichnet und verstärkt wird (Transient). Der optimale Radius für die Detektion befindet sich etwa zwischen 70 – 90% des Zellradius'. Das so aufgezeichnete Signal wird nun mittels Fourier Transformation aus der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne überführt (Abbildung 13). Dieser Transient weist über die Zeit einen Abfall auf, der bei vollständigem Abklingen auf null zurück gehen würde. Aus diesem, auch als freiem Induktionsabfall (FID) bezeichnetem Signalverlauf, lässt sich mittels FT ein Fre-

quenzsignal errechnen, das für eine Ionenart theoretisch die Form der Lorentz-Kurve annimmt. Da aber aus Effizienzgründen bei der Aufzeichnung der Messsignale häufig nicht bis zum absoluten Abklingen des FID abgewartet wird, ist der resultierende Transient ein Kreuzprodukt aus dem vollständigen Transienten und einer Schnittfunktion, was das Auftreten von Seitenbanden neben dem Hauptsignal zur Folge hat.

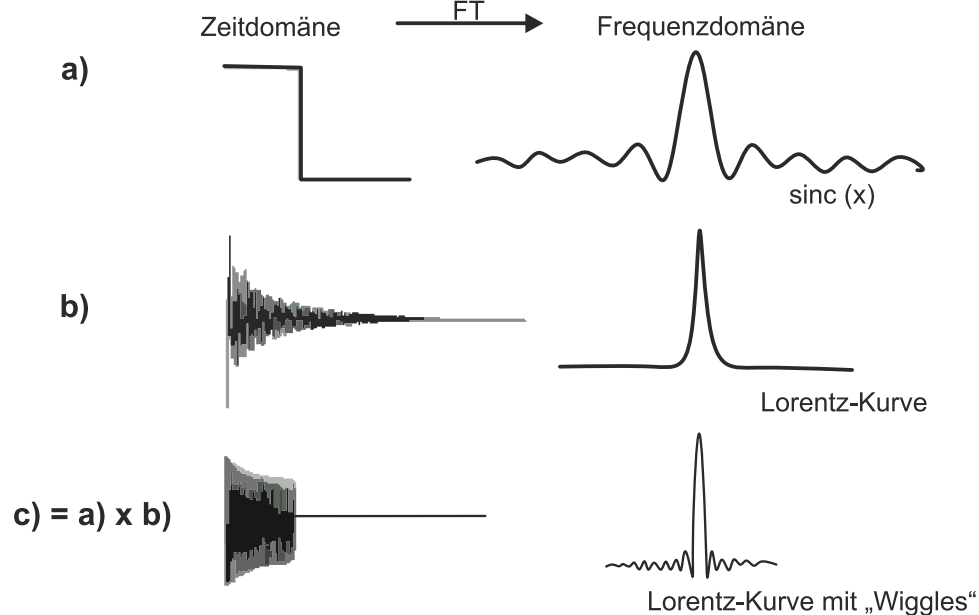


Abbildung 13 Auswirkungen der Fourier-Transformation auf verschiedene Eingangssignale (Gross 2013)

Mittlerweile gibt es zwar einige Ansätze diesen Effekt zu minimieren (z.B. Apodisierung, Zero-filling), allerdings können vereinzelt noch Artefakte auftreten. Die sehr genaue Bestimmung der Frequenz und der Zeit, ist dabei der entscheidende Faktor für die extrem hohe Massenauflösungen. Die Bestimmung genauer m/z -Verhältnisse ist deswegen so wichtig, weil die exakten Isotopenmassen leicht von den nominalen Massen abweichen. Zwar haben sich im Laufe der vergangenen Jahrzehnte die Bezugssysteme gewechselt, seit den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts hat man sich aber auf eine Bezugsgröße festgelegt. Diese entspricht $1/12$ der Masse des ^{12}C -Isotops und definiert somit auch die Massendefekte der anderen Isotope. Eine Auflistung der häufigsten Massendifferenzen zwischen Isotopenmasse und Nominalmasse ist in der Tabelle

Dazu werden die ermittelten Frequenzen einfach per Kalibrierung in Massen umgerechnet. Dadurch lassen sich nun isobare Substanzen, d.h. Spezies mit gleicher Nominalmasse, voneinander trennen. Selbst kleinste Massenabstände von bis zu 3,4 mDa lassen sich über einem weiten Massenbereich, bis zu einem m/z -Verhältnis von 1.000 ($R \approx 300.000$), separie-

ren. Gleichzeitig erlaubt die Massengenauigkeit, die Zuweisung von elementaren Zusammensetzungen für detektierte m/z . Dabei werden die molaren Massen möglicher Elemente in der entsprechenden Anzahl aufsummiert. Der Vorteil hierbei ist, dass die Prozedur automatisiert durchgeführt werden kann, da die Anzahl der m/z und entsprechend zugewiesener Summenformeln leicht mehrere tausend erreichen kann. Der Nachteil ist allerdings, dass hierbei noch keine Validierung der Summenformeln erfolgt. Lediglich die m/z -Verhältnisse, für die sich keine elementaren Zusammensetzungen in einem gewissen Toleranzintervall zuweisen lassen, werden ausgeschlossen. Deswegen müssen sowohl mögliche Elemente und deren maximale Anzahl, als auch ein Toleranzintervall für die Genauigkeit der errechneten Summenformeln vorgegeben werden, damit die Summenformelzuweisung funktionieren kann. Dabei kann man sich leicht vorstellen, dass die Anzahl errechneter Summenformeln für höhere m/z ansteigt. Die mögliche Anzahl ist an dieser Stelle im Wesentlichen von der Auswahl zugelassener Elemente und dem Toleranzintervall bzw. der Massengenauigkeit, welche die Grenzen des Toleranzintervalls maßgeblich beeinflusst, abhängig.

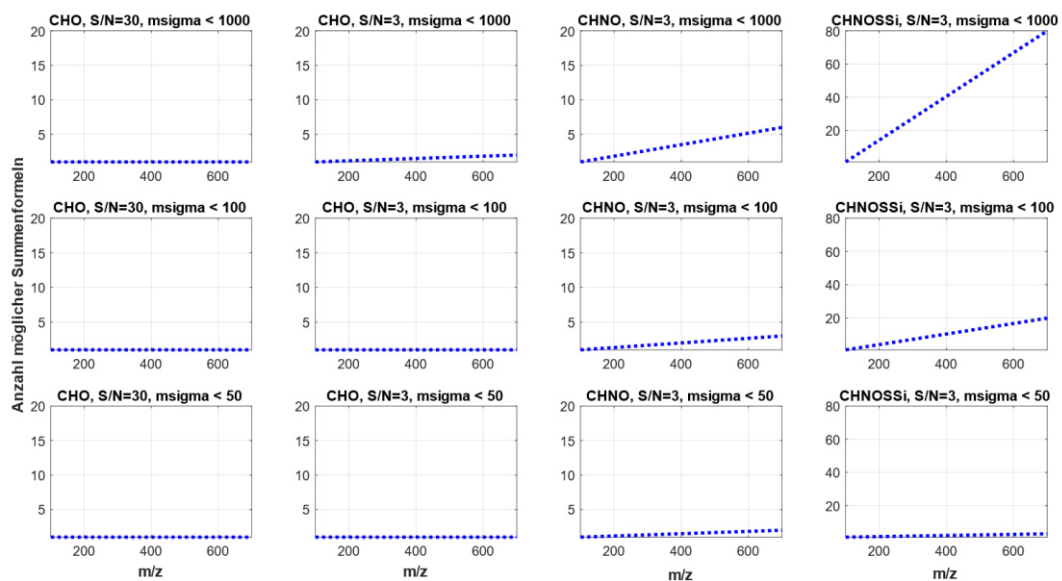


Abbildung 14 Einfluss der Elementaren Zusammensetzung und des Toleranzintervalls auf die mögliche Anzahl der Summenformeln pro nominaler Masse

Es wird natürlich immer eine eindeutige Zuweisung von einer Summenformel pro m/z -Verhältnis angestrebt. Ohne dies, ist die weitere Datenauswertung bestenfalls ungenau. Für die Limitierung bzw. Filterung der Mehrfachzuweisungen gibt es mittlerweile eine große Anzahl von Möglichkeiten, z.B. die, die probenspezifische Regeln und Werkzeuge darstellen (HERTKORN ET AL. 2008; REEMTSMA 2009; SCHWEMER ET AL. 2015) und andere, die probenunabhängige Ansätze enthalten (KIND AND FIEHN 2007; KOCH ET AL. 2007). Heutzutage wird für

die Datenevaluierung und Summenformelzuweisung fast immer eine Kombination aus mehreren Filtern und Regeln verwendet. Natürlich ist die Massengenauigkeit hierbei ein maßgebender Faktor, wie aus Abbildung 14 deutlich wird. Da die Massengenauigkeit in der Regel aber instrumentenabhängig ist und nicht immer die Möglichkeit für ein neues Instrument gegeben ist, falls die gewünschte Massengenauigkeit nicht erreicht wird, dürfen für die Zuweisung elementarer Zusammensetzungen die anderen Hilfen nicht außer Acht gelassen werden.

Die Evaluierung der Summenformeln ist natürlich nicht beschränkt auf Ionenfallen und insbesondere ultra-hochauflösende Massenspektrometer. Im Gegenteil, Geräte mit geringerer Massenauflösung profitieren unter Umständen sogar noch stärker von der Anwendung, weil eine mangelnde Massenauflösung durch das geschickte und intelligente Filtern von zugewiesenen Summenformeln kompensiert werden kann. Die letztgenannten Geräte weisen natürlich auch andere Detektoren auf. Weit verbreitet sind z.B. Photomultiplier, Sekundärelektronenvervielfacher (SEV), Faraday-Auffänger, Daly-Detektoren, Mikrokanalplatten (MCP) oder Channeltrons. Diese Detektoren werden häufig danach unterschieden, ob sie ortsabhängige oder zeitabhängige Datenaufnahmen durchführen. Bei den ortsabhängigen werden die Ionen auf unterschiedliche Bahnen gelenkt und deshalb an separaten Stellen detektiert (z.B. Array-Detektoren). Die zeitabhängigen registrieren die Ionen hingegen chronologisch.

2.4 Analysemethoden

Um Proben zu charakterisieren gibt es zwei grundlegende Ansätze. Der Erste besteht darin die Probe nur auf selektierte Substanzen hin zu untersuchen. Die Anzahl der Substanzen ist dadurch limitiert, und durch Kalibrierung können diese Substanzen auch quantifiziert werden. Diese Art der Analyse wird auch als „Target“ Analyse bezeichnet, weil sie Proben zielgerichtet auf genau definierte Substanzen untersucht.

Ein anderer Ansatz findet Anwendung, wenn nicht definiert ist, welche Substanzen in der Probe vorhanden sind. Dann wird eine scannende Methode verwendet, die uneingeschränkt alle Substanzen der Probe erfasst. Diese Art der Analyse wird auch als „Screening“ bezeichnet und hat den Vorteil, dass man einen Überblick über die in der Probe befindlichen Substanzen bekommt (unter Berücksichtigung der Ionisierung). Diese Methode kann auch verwendet werden, wenn sehr viele Substanzen in der Probe vorhanden sind. Da mittels Ionisierungsart die Selektivität der Analyse und der detektierten Substanzen in der Probe beeinflusst werden kann. Die selektive Ionisierung erlaubt in der Regel, die korrespondierenden Substanzen häufig deutlich sensitiver zu bestimmen. Dabei hängt es von der verwendeten

chromatografischen Methode ab, in wie weit Substanzen vollständig voneinander isoliert werden können. Zusätzlich ist auch die absolute Anzahl der Substanzen in der Probe ein entscheidender Faktor für die Auftrennung. Da der „Screening“ Ansatz versucht so viele Substanzen wie möglich zu erfassen, ist die Auflösung der Methode ein entscheidender Parameter. Da auf Grund der großen Anzahl an Analyten nicht immer Vergleichsstandard verwendet werden kann, muss für die Charakterisierung der Substanzen eine möglichst vollständige Isolierung und so viele Zusatzinformationen wie möglich über die Probe und Substanzen generiert werden. Durch die ungerichtete Detektion erlaubt diese Methode dafür einen Überblick über alle Substanzen zu bekommen und bietet zusätzlich die Möglichkeit unbekannte Substanzen in der Probe zu untersuchen. Da wie der Name schon sagt keine Informationen über diese Substanzen in der Probe vorhanden sind, ist jedes zusätzliche Detail von enormem Wert für die Identifizierung dieser Komponenten.

2.5 Stand der Technik

Die Kopplung aus GC und hochauflösenden Massenspektrometer ist schon seit vielen Jahren eine etablierte und leistungsfähige Kombination zweier Techniken. Am Anfang noch mit Sektorfeld-MS kombiniert, vermag der GC die Substanzen anhand der Wechselwirkungen mit der stationären zeitlich aufzutrennen und das Massenspektrometer liefert Informationen zur Identifizierung der Komponenten (HOLMES AND MORRELL 1957). Die Weiterentwicklung der Ionenfallen und speziell der ultra-hochauflösenden Massenspektrometern (FT-ICR, Orbitrap) verbesserte die Massenauftrennung der Substanzen enorm und führte kurzzeitig dazu, dass die Kopplungen von Chromatographischen Trennungen mit HR-MS Geräten vernachlässigt wurden. Schnellere Messungen und Einsparung der Probenvorbereitung, bei Chemikalien und geringere Verunreinigungen sind wesentliche Vorzüge der „direct infusion“ Technik. Doch recht schnell erkannte man, dass die chromatographischen Trennung in Kombination mit HR-MS für komplexe Proben auch einige Vorteile für die Analyse hat. So kann die Auftrennung der Probe die Unterdrückungs- und Matrixeffekte bei weichen Ionisierungen reduzieren, sodass deutlich mehr Substanzen detektiert werden können. Zusätzlich ermöglicht die Chromatographie auch die Trennung von isomeren Spezies, die sonst nur sehr schwer oder gar nicht zugänglich sind. In Kombination mit der selektiven Ionisierung, APCI, gelang es erstmals der Arbeitsgruppe um E.C. Horning Anfang der 70er eine funktionierende Methode aus GC, APCI und MS zu etablieren (HORNING ET AL. 1973). In den folgenden Jahrzehnten wurde diese entwickelte Methode nur wenig adaptiert und verbessert. Die Hauptanwendungsgebiete auf Grund der Selektivität waren damals wie heute die Pestizid- bzw. die Metabolit Analytik.

Viele Jahre später wurde diese Methode dann erstmals zur Charakterisierung von Flammenschutzmitteln und Weichmachern mit einem hochauflösenden Massenspektrometer gekoppelt (BALLESTEROS-GÓMEZ et al. 2013). Dabei wurden erstmalig die Vorteile der weichen Ionisierung, die Bildung von Molekülionen und die Zuweisung von Summenformeln zu detektierten m/z -Verhältnissen in einer nicht-zielgerichteten Screening Methode eingesetzt um unbekannte Flammenschutzmittel in den Proben zu analysieren.

Seitdem fand die Methode auch in anderen Forschungsgebieten Anwendung, wie dem „Profiling“ von Metaboliten oder der Analytik von Pestiziden (PORTOLÉS et al. 2012; STREHMEL et al. 2014; PORTOLÉS et al. 2014; WACHSMUTH et al. 2015). Durch das Nutzen der FTICR-Technologie konnte eine noch leistungsfähigere Screening-methode entwickelt werden (BARROW et al. 2014; SCHWEMER et al. 2015; ZUBER et al. 2016; RARO et al. 2016). Bei dieser wurde erstmals das Potential der Kombination aus GC, APCI und HRMS ausgenutzt und eine Analyse aller detektierten, hochaufgelöster Ionenspuren durchgeführt. Nachteil dieser Methode ist aber die langsame Acquisitionszeit pro Messung, sodass die chromatographische Auflösung immer in Konkurrenz zur Massenauflösung tritt. Das bedeutet, je höher die resultierende Massenauflösung sein soll, desto länger müssen die Acquisitionszyklen des Massenspektrometers sein und desto weniger Massenspektren werden in einem fixen Zeitraum generiert.

Außerdem findet man in Analysen die gaschromatographische Trennung nutzen immer wieder die Normierung auf einen Retentionsindex. Dies wird angewendet, damit die detektierte Retentionszeit der Analyten weitgehend unabhängig von der Apparatur ist und somit mit Retentionswerten aus Datenbanken verglichen werden kann. Erstmal wurde das Prinzip von E. Kováts publiziert (KOVÁTS 1958). Er fokussierte sich damals auf die Bestimmung aliphatischer Verbindungen. Seit damals wurden eine Vielzahl verschiedener Indices entwickelt, die Anwendung für unterschiedliche Substanzklassen finden (CASTELLO 1999). Beim Kováts Index werden die Retentionszeiten der Analyten ins Verhältnis zur Elution der Alkane gesetzt. Damit die Normierung sinnvoll anwendbar ist, sollten die Analyten ähnliche Wechselwirkungen zu den chromatographischen Phasen eingehen wie das Bezugssystem. Für die Untersuchung von aromatischen Kohlenwasserstoffen wird z.B. der Lee Index (LEE et al. 1979; VASSILAROS et al. 1982) verwendet. Damit die Werte zwischen den verschiedenen Bezugssystemen auch verglichen werden können, gibt es Umrechnungsfunktionen (BABUSHOK and LINSTROM 2004). So lassen sich auch Werte, die mit dem Bezugssystem der polyaromatischen Kohlenwasserstoffe normiert wurden in einen Kováts Index umrechnen.

3. Ergebnisse

3.1 Apparatur und Entwicklung einer GC-APCI-FTICR-MS

Methode

Die Idee der Entwicklung und Optimierung einer Methode zur Bestimmung von Analyten mittels GC-APCI-FTICR MS wurde durch diverse Studien inspiriert (SCHAUER et al. 2005; HILLER et al. 2009; CARRASCO-PANCORBO et al. 2009; BRISTOW et al. 2010; WACHSMUTH et al. 2011). Der Aufbau der Apparatur erfolgte dabei analog dem Schema in Abbildung 15.

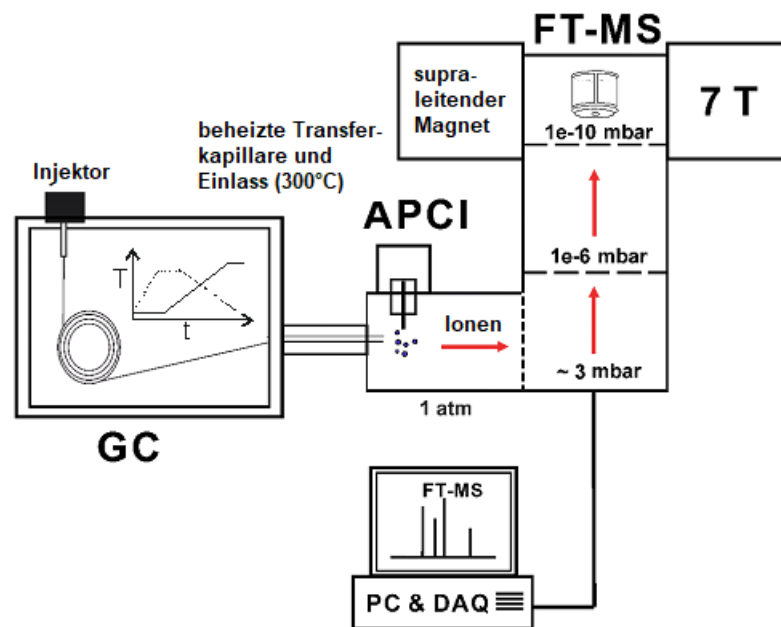


Abbildung 15 Schema der GC-APCI-FTICR MS Apparatur

Die genutzte Apparatur besteht aus einem Gaschromatographen (Model CP 3800 Gaschromatograph, Varian Technologies) ausgestattet mit einem temperaturprogrammierbaren (PTV) Injektor, der das Einbringen von Feststoffen und größeren Volumina flüssiger Proben ($>10 \mu\text{L}$) ermöglicht. Der GC ist mittels beheizbarer Transferkapillare mit einer APCI-Quelle verbunden, die ebenfalls beheizbar ist. Für diese Forschungsarbeit wurden zwei unterschiedliche APCI Quellen (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Deutschland) verwendet [„APCI I“ und „GC-APCI II“]. Die APCI-Quellen sind direkt an das Apex Qe Series // Fourier Transformation Ionen Zyklotron Resonanz (FT-ICR) MS System (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Deutschland) gekoppelt, das mit einem 7 T supraleitenden Magneten (Bruker Biospin, Frankreich) ausgestattet ist.

3.2 GC-APCI/MS bei Trägergasgeschwindigkeiten deutlich über dem Optimum

Bei fast jedem chromatographischen Prozess steht die Trennleistung im Vordergrund. Dabei wird bei fast allen chromatographischen Trennungen darauf geachtet, dass die Fließgeschwindigkeit einer mobilen Phase im Van-Deemter Optimum liegt, da hier die Anzahl theoretischer Trennböden oder möglicher Gleichgewichtseinstellungen maximal für die gewählte mobile Phase ist (siehe Abbildung 16). Bei Erhöhung der Fließgeschwindigkeit über das Optimum der Van-Deemter Funktion kann es zu verzerrten Peakformen und verschlechterter Trennleistung kommen. Andererseits kann durch die höhere Fließgeschwindigkeit, die Zeit für die gesamte chromatographische Trennung erheblich verkürzt werden, was den Durchsatz erheblich steigern kann.

Die Van-Deemter Gleichung zeigt (siehe Abbildung 16), dass für jede Kombination aus Eddy-Diffusion, longitudinaler Diffusion und der Einstellung eines chemischen Gleichgewichtes zwischen mobiler und stationärer Phase bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit ein Minimum existiert.

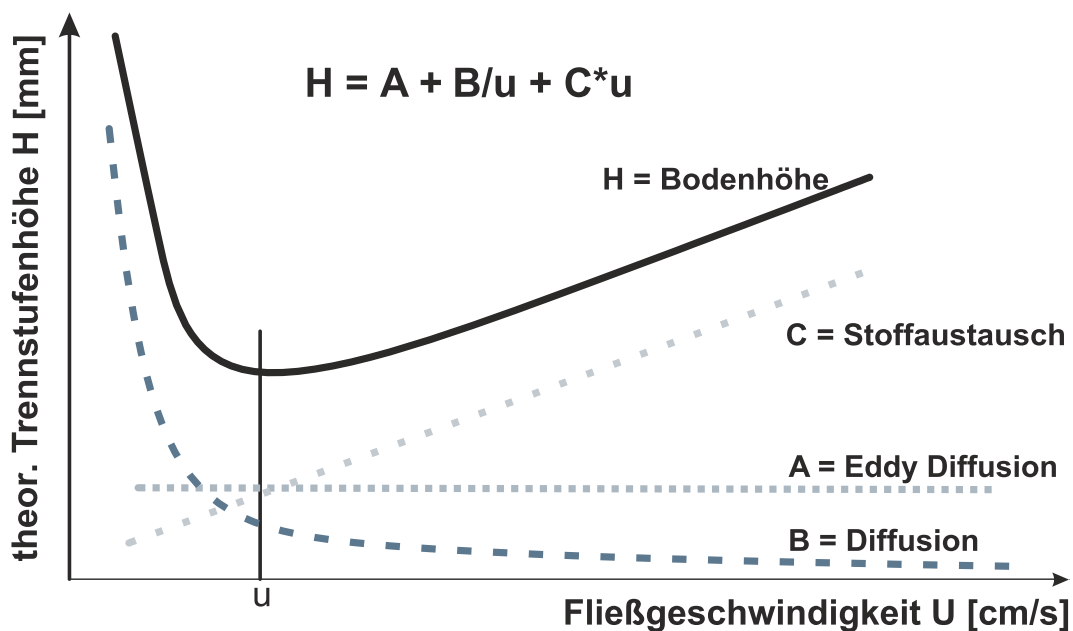


Abbildung 16 Van-Deemter Funktion mit Termen (adaptierte Darstellung (APRENTAS 2017))

In diesem Punkt ist die chromatographische Trennleistung am größten, weswegen standardmäßig dieser Wert bei der Festlegung der Fließgeschwindigkeit in der Methode gewählt wird. Da die meisten Analysen auf die bestmögliche chromatographische Trennung ausgelegt sind, wird nur in Ausnahmefällen von diesem Wert abgewichen. Lediglich wenn die Trennzeit ein kritischer Faktor ist, die Analyten instabil sind oder die Analyten chromatographisch sehr

isoliert voneinander vorliegen, wird auf eine höhere Fließgeschwindigkeit zurückgegriffen. Für diese Untersuchungen wurden aber ganz bewusst höhere Fließgeschwindigkeiten verwendet, da laut Van-Deemter Gleichung der Einfluss der longitudinalen Diffusion (B – Term) mit steigender Fließgeschwindigkeit abnimmt. Die Trennleistung wird dabei im Vergleich zu Werten vor dem Optimum der Van-Deemter-Funktion nur geringfügig verschlechtert.

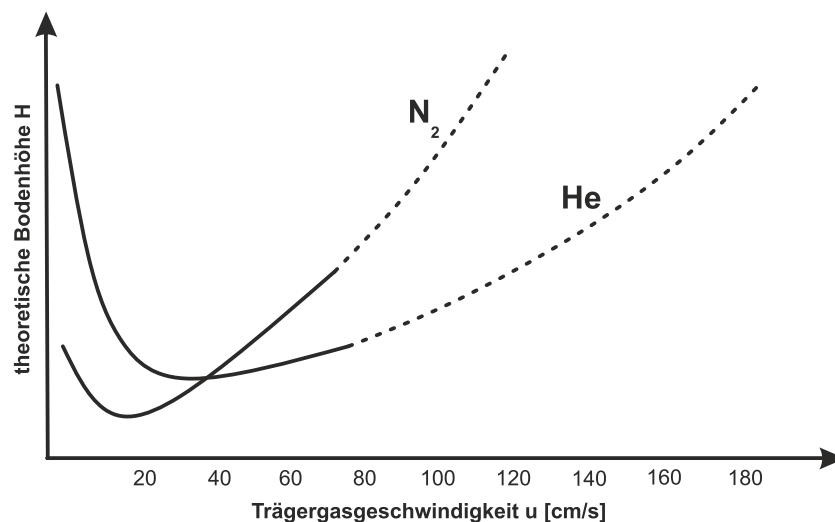


Abbildung 17 Van Deemter-Funktion für Helium

Zusätzlich kann eine höhere Fließgeschwindigkeit, im Beispiel der Gaschromatographie, auch Einfluss auf das detektierte Substanzspektrum und die Nachweisgrenze der Analyten haben. Hinweise darauf gaben Publikationen von Amirav und Fialkov (DAGAN and AMIRAV 1994; FIALKOV et al. 2003; FIALKOV and AMIRAV 2004), sowie eine Studie über die Analyse von Decabromodiphenylethern (bromierte Flammenschutzmittel) (BENDIG and VETTER 2013), die durch Erhöhung der Fließgeschwindigkeit von 1.2 mL/min (29 cm/s) auf 10 mL/min (183 cm/s) nicht nur die Trennzeit verkürzen, sondern auch die Nachweisgrenze verbessern konnten.

Um abschätzen zu können, wie genau der Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die Trennleistung ist und in welchem Verhältnis er zur gesamten chromatographischen Analysezeit steht, haben wir diese Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde das Substanzspektrum einer Rohöl-Probe mit mittel- und hochsiedenden Fraktionen bei verschiedenen Trägergasgeschwindigkeiten analysiert. Zusätzlich wurden die chromatographischen Trennungen mit zwei unterschiedlichen Trägergasen durchgeführt und die resultierenden Daten untereinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit tatsächlich das detektierte Substanzspektrum zu höhermolekularen Verbindungen verschiebt. Die

Abbildung 18 belegt, dass sich das Substanzspektrum und die Anzahl detektierter Komponenten, bei ansonsten konstanten Bedingungen, bei erhöhter Fließgeschwindigkeit leicht nach oben erweitert. Nach der Datenauswertung und Validierung zugewiesener Summenformeln ließen sich in einem Bereich über m/z 460 zwischen 20 – 100% mehr Summenformeln detektierten m/z -Verhältnissen zuweisen.

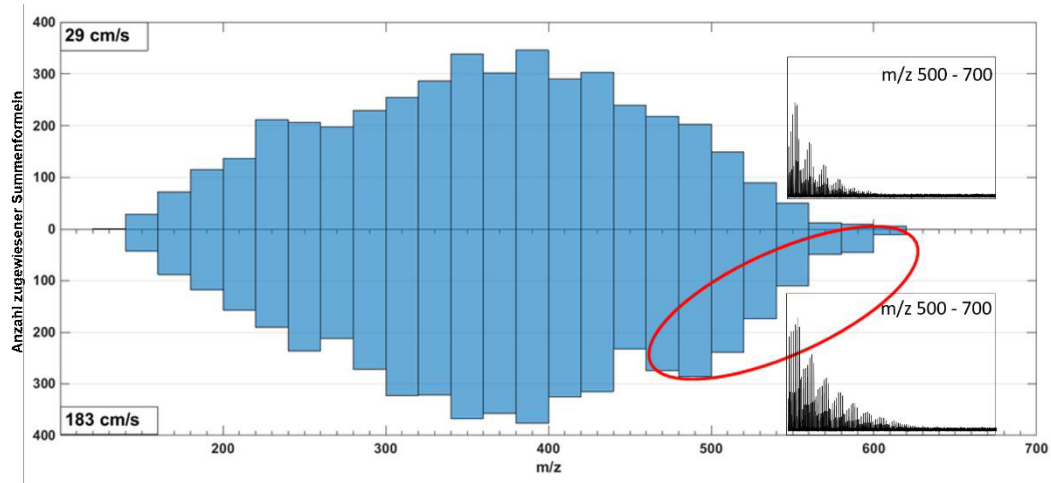


Abbildung 18 Histogramm zugewiesener Summenformeln einer Rohöl Probe bei Fließgeschwindigkeiten von 29 cm/s und 183 cm/s mit gemittelten Massenspektren in einem Bereich von m/z 500 – 700

Durch die Analyse der Summenformeln konnte bestätigt werden, dass es sich bei den hinzugekommenen Substanzen um höher-molekulare Vertreter bereits detektierter homologer Reihen handelt.

Die Anzahl der detektierten Komponenten hat sich somit durch die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit erhöht. Die Verbesserung der Nachweisgrenzen konnten aber in dieser Studie für das komplexe Gemisch der Analyten in der Rohölprobe nicht nachgewiesen werden.

Es zeigte sich jedoch wie erwartet, eine direkte Abhängigkeit der Analysezeit von der Fließgeschwindigkeit. Dabei wiesen Analyten mit höheren Flüchtigkeiten (niedrigeren Siedepunkten) eine kürzere, effektive Trennzeit auf.

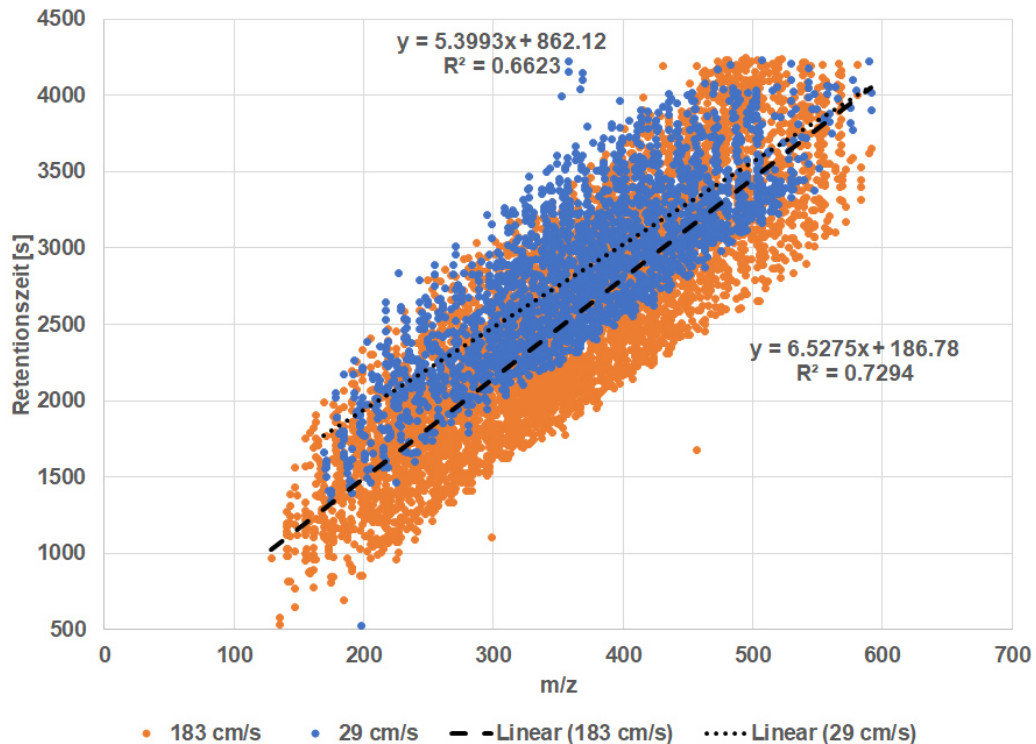


Abbildung 19 Korrelation der detektierten m/z -Verhältnisse und den korrespondierenden Elutionszeiten einer Rohölprobe für verschiedene Trägergasgeschwindigkeiten

Betrachtet man die Substanzen mit den höchsten m/z -Verhältnissen, besitzen diese vergleichsweise niedrige Flüchtigkeiten und somit die geringste Beeinflussung der Retentionszeit. Natürlich hängt die entsprechende Retentionszeit im Wesentlichen von den Wechselwirkungen mit der stationären Phase ab. In diesem Fall wurde eine Rohölprobe mittels einer handelsüblichen DB-5 Kapillartrennsäule mit 5% Phenyl- und 95% Methylpolysiloxan verwendet. Die durchschnittliche Differenz zwischen den beiden verwendeten Fließgeschwindigkeiten lässt sich in Abhängigkeit des m/z -Verhältnissen beschreiben:

$$D = -1.128 \frac{m}{z} + 675.34 \quad (3.1)$$

Formel 6 Berechnung der Elutionsdifferenz (D) in Sekunden bestimmter Komponenten einer Rohölprobe zwischen Fließgeschwindigkeiten von 29 cm/s und 183 cm/s

Die effektive Trennzeitverkürzung einer bestimmten Substanz nimmt also mit sinkender Masse bzw. sinkender Wechselwirkung mit der stationären Phase zu, wie Abbildung 19 zeigt. Für Phenanthren und Anthracen, die beide noch zu mittel-flüchtigen Verbindungen gezählt werden können, konnte eine Reduktion der effektiven Trennzeit für die ansonsten identischen Methoden von fast 30% erreicht werden. Gleichzeitig tritt eine Verschlechterung der chromatographischen Trennleistung ein, da die höhere Fließgeschwindigkeit weniger

theoretische Einstellungen des Gleichgewichtes zwischen mobiler und stationärer Phase erlaubt.

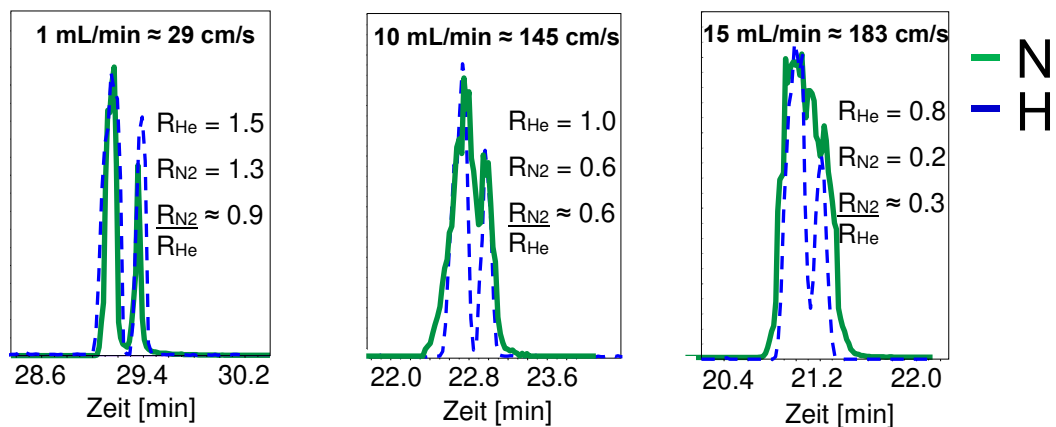


Abbildung 20 Auftrennung der normierten, extrahierten Ionenspuren von Phenanthren und Anthracen bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten und unterschiedlichen Trägergasen (Helium und Stickstoff) und der korrespondierenden chromatographischen Auflösungen (R)

Als Richtwert für eine vollständige Trennung kann hier der Wert 1,5 für die chromatographische Auflösung (R) angesehen werden, da bei diesem Wert noch eine Überlappung von 0,3% der Peakfläche vorliegt.

$$R = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{FWHM_1 + FWHM_2} \quad (3.2)$$

Formel 7 Chromatographische Auflösung

Vergleicht man nun die erzielten Auflösungen der Analyten bei den beiden verwendeten Trägergasen miteinander, so zeigt sich mit steigender Trägergasgeschwindigkeit die chromatographische Auflösung immer stärker abnimmt. Bei der Verwendung von Stickstoff zeigt sich bereits bei kleineren Trägergasgeschwindigkeiten eine deutlichere Verschlechterung der chromatografischen Trennleistung, im Vergleich zu Helium (Abbildung 20). Die Verschiebung spiegelt sich auch im Verhältnis der beiden Auflösungen wider. Mit steigender Trägergasgeschwindigkeit nimmt die Auflösung überproportional für Stickstoff ab. Dieser Umstand lässt sich auch aus den dazugehörigen Van-Deemter Funktionen erklären (Abbildung 17). Die Funktionen beider Trägergase bewegen sich nach dem Van-Deemter Optimum für vergleichbare Trägergasgeschwindigkeiten immer weiter auseinander. Das ist gleichbedeutend mit der Zunahme der Trennleistungsdifferenz.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, die Retentionszeit und die gesamte chromatographische Analysezeit wird durch die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit verkürzt. Infolgedessen kann für ein definiertes Trennproblem in einem Labor die Anzahl der möglichen Analysen und damit die Produktivität entsprechend gesteigert werden. So lässt sich z.B. für die Auftrennung von Phenanthren und Anthracen mit Helium bei einer Erhöhung von 29 cm/s auf 145 cm/s bei einer noch vertretbaren chromatographischen Auflösung eine Verkürzung der Trennzeit um 23% erreichen.

Dabei wird das Komponentenspektrum einer Rohöl-Probe geringfügig vergrößert. Die Erweiterung des Substanzspektrums konzentriert sich auf hochmolekulare Verbindungen oberhalb eines m/z -Verhältnisses von 460. Durch die verringerte chromatographische Auflösung wird die Peakform partial verschlechtert und die Identifizierung der Substanzen erschwert.

3.3 Charakterisierung von Metaboliten und Substanzen im Spurenbereich bei der Herstellung von Heroin

Um zu untersuchen, ob die entwickelte Methode in der Lage ist auch reale Proben zu analysieren, wurde die Methode bei einer Studie zur Bestimmung und Charakterisierung von Metaboliten und Spurenstoffen im Heroinherstellungsprozess genutzt. Dazu wurden Proben, die das Bundeskriminalamt (BKA) in einem realen Heroinlabor beschlagnahmt hat, mit verschiedenen Techniken untersucht und verglichen. Da es im Bereich der Charakterisierung und Identifizierung von Metaboliten im Heroin nur wenige Studien gibt, ist jede zusätzliche Information über die identifizierten Substanzen wertvoll. Eine Vielzahl dieser Studien basieren auf dem Prozess von Thiboumery und Mohr, bei dem das Morphin mit Kalziumoxid und Ammoniumchlorid extrahiert wird und anschließend eine Acetylierung mit Essigsäureanhydrid durchgeführt wird (UNITED STATES OF AMERICA 1987; UNITED NATIONS OFFICE OF DRUGS AND CRIME 1998; UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME 2003). Während der Konversion des Morphins zu Diacetylmorphin werden auch viele weitere Alkaloide im Opium acetyliert. Zwar gibt es einige wenige Arbeiten, die sich mit den Formulierungsmechanismen von Neben- und Beiprodukten der Heroinherstellung beschäftigen, aber diese fokussieren sich hauptsächlich auf die acetylierten Metabolite der alkaloiden Hauptkomponenten (ALLEN et al. 1984a; ALLEN et al. 1984b; TOSKE et al. 2006). Tatsächlich generieren aber die Beiprodukte und Spurenstoffe ein spezifisches Substanzprofil, welches entscheidend bei dem Vergleich von sichergestellten Heroinproben zur Aufdeckung von Übereinstimmungen helfen kann. Die meisten „Profiling“ Methoden der forensischen Analytik beschränken sich bei der Erkennung und Quantifizierung auf die acetylierten Alkaloide, die häufig in illegalen Heroinproben gefunden werden (NEUMANN and GLOGER 1982; STRÖMBERG et al. 2000; LURIE and TOSKE 2008; MORELLO et al. 2010; DEBRUS et al. 2011; LURIE et al. 2013). Aus diesem Grund hat das Deutsche Heroin Analyse Programm (HAP) des Bundeskriminalamtes beschrieben welche Attribute, Hauptkomponenten, Verunreinigungen, Verdünnungsmittel, Lösungsmittel und organischen Spurenstoffen der Probe auf der Basis der sauren Extraktion bestimmt werden sollten.

Für diese Studie wurden beschlagnahmte Proben aus einer authentischen, afghanischen Heroin Herstellung untersucht. Als Basis diente eine Analyse der Proben mittels GCxGC-TOFMS, um mittels der chromatographischen Trennleistung und der hohen Empfindlichkeit

ein Profil der forensisch relevanten Substanzen zu bekommen. Bei herkömmlichen Kopplungen aus GC und EI-MS mit Einheitsauflösungen sind ausschließlich Mustervergleiche der Fragmentspektren mit Datenbanken möglich.

Zur Charakterisierung unbekannter Komponenten bietet sich der Einsatz von hoch-auflösenden Massenspektrometern an, da diese eine Zuweisung einer elementaren Zusammensetzung zu dem gefundenen m/z -Verhältnis ermöglichen. Da von unbekannten Verbindungen keine Informationen über die Struktur oder ihre Bestandteile vorliegen, ist es von großer Bedeutung die Molekülmassen und die entsprechenden Summenformeln zu kennen. Die Übertragung von zu hoher Ionisierungsenergie (wie. Z.B. bei der Elektronenstoßionisierung) führt bei einigen Substanzen zu so starker Fragmentierung, dass kein Molekülpeak detektierbar ist. Zum Erhalt dieser Informationen müssen weichere Ionisierungsformen eingesetzt werden. Hier bietet sich z.B. die Photo- (APPI) oder die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) an.

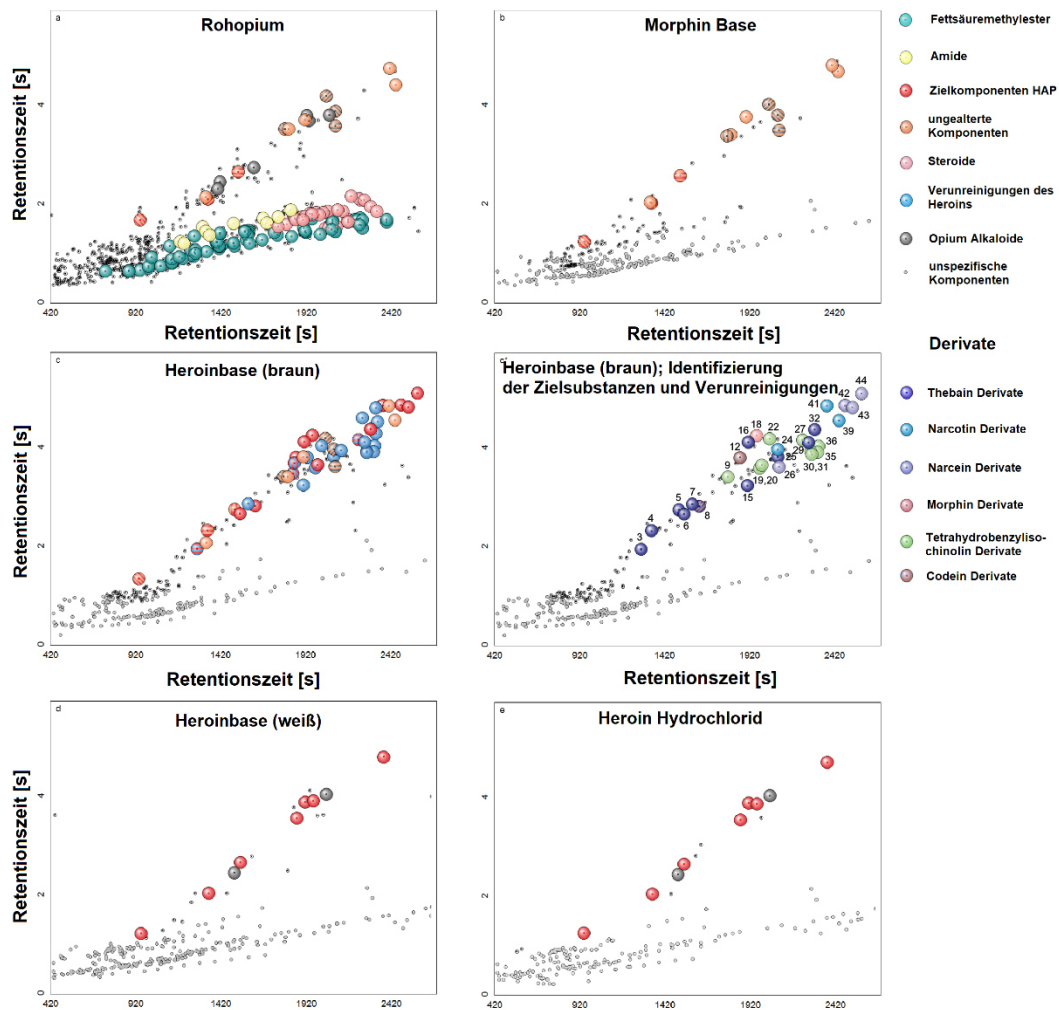


Abbildung 21 Blasendiagramm des sauren Extrakts der verschiedenen Stufen des Heroin-Herstellungsprozesses basierend auf den Ergebnissen der GCxGC Analyse a) Rohopium b) Morphin Base c) Heroin Base (braun) d) Heroin Base (weiß) e) Heroin Hydrochlorid; [a–e] rot: Zielkomponenten des HAP, schwarz: Opiumalkaloide, orange: unveränderte Substanzen in allen Herstellungsstufen (bis auf braune Heroinbase), gelb: Amide, grün: Fettsäuremethylester (FAMES), pink: Steroide, blau: weitere Verunreinigungen der Heroinbase; [c*] Heroinbase (braun): Charakterisierung der Zielkomponenten und Identifizierung der Verunreinigungen; braun: Codein-Derivate; hellgrün: Tetrahydrobenzylisochinolin-Derivate; dunkelblau: Thebain-Derivate; pink: Morphin-Derivate; türkis: Narcotin-Derivate; lila: Narcein-Derivate

Die einzelnen Prozessschrittproben wurden parallel so mittels niederauflösender GC-EI-TOFMS, hochauflösender GC-EI-HRTOFMS und der GC-APCI-FTICRMS Methode untersucht. Die Einheitsauflösung der EI-TOFMS Spektren wurde für den Vergleich zu Referenzspektren aus Datenbanken genutzt. Die EI-HRTOFMS Spektren lieferten die entsprechenden elementaren Zusammensetzungen der Fragmente, um eine mögliche Struktur postulieren zu können. Die APCI-FTICRMS Methode lieferte Information zur Molekülmasse. Mithilfe

aller Daten konnten nötige Informationen gesammelt werden, um den bislang unbekannten Verbindungen Strukturen zu zuweisen und sie zu identifizieren.

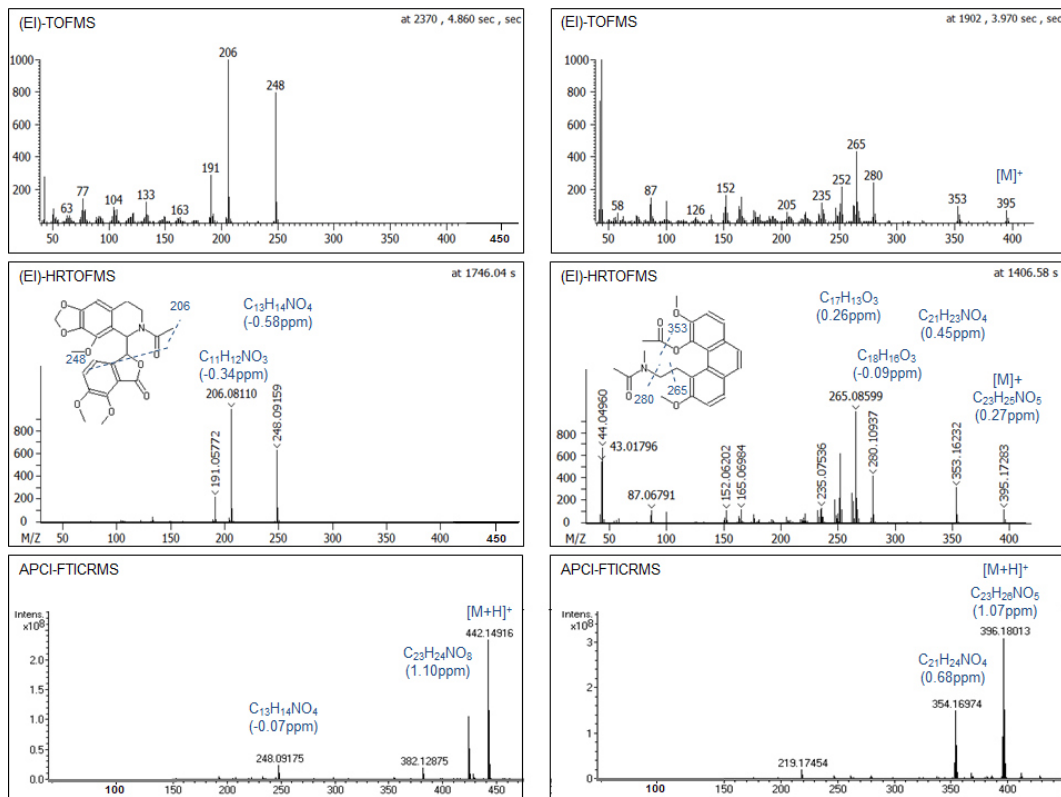


Abbildung 22 Aufgenommene Massenspektren von N-Acetylnornarcotin (links) und 3,6-Dimethoxy-4-acetoxy-5-(2-(N-methylacetamido))ethylphenanthren (rechts) mittels EI-TOFMS und APCI-FTICRMS

Im Zuge dieser Untersuchung konnten neben der Charakterisierung des gesamten Herstellungsprozesses auf Basis der gefunden Verunreinigungen, auch 44 Verunreinigungen in der braunen Heroinbase nachgewiesen werden. Darunter waren 18 Zielsubstanzen des Deutschen Heroin Analyse Programms. Für zwölf Verbindungen, darunter vier Opiumalkaloide, konnte gezeigt werden, dass diese direkt aus dem Rohopium stammen und nicht durch den Herstellungsprozess verändert werden. Für 21 der acetylierten Verbindungen sind die Ausgangsverbindungen bekannt oder konnten identifiziert werden. Nicht alle der entdeckten Substanzen konnten während der Untersuchung identifiziert werden, da sie teilweise auch bei geringerer Ionisierungsenergie zu starker Fragmentierung neigten und eine Detektion des Molekülpeak nicht möglich war.

3.4 Entwicklung und Validierung der Programm-gesteuerten Datenauswertung

Die Kombination aus Gaschromatographie, chemischer Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) und der hochauflösenden Massenspektrometrie ermöglicht einen besseren Einblick in die chemische Zusammensetzung einer Probe, gleichzeitig werden aber enorme Datenmengen erzeugt. Diese sind so gewaltig, dass die manuelle Auswertung sehr zeitaufwendig ist. Zusätzlich besteht durch die thermische Belastung bei der gaschromatographischen Trennung und der anschließenden Ionisierung mittels Koronaentladung (APCI) ein gewisses Potential zur Bildung von Artefakten (AMUNDSON et al. 2012; DAVID et al. 2013) und kompetitiven Reaktionen (GHISLAIN et al. 2012). Aus diesem Grund wurden automatische Routinen entwickelt, die in der Lage sind die großen Datenmengen zu prozessieren und selbständig Artefakte wie z.B. Bildung von Wasser- oder Sauerstoffaddukten, Demethylierung, Dehydrogenierung und Decarboxylierung zu erkennen und von der weiteren Datenanalyse auszuschließen. Um die Validierung der detektierten Substanzen noch weiter zu verbessern, wurde auf Basis der exakten Molekülmassen und der daraus errechneten Doppelbindungsäquivalente (DBE) (PELLEGRIN 1983) ein „vermutlicher Retentionsindex“ eingeführt. Dieser ermöglicht die Verifizierung von Summenformeln anhand ihrer detektierten Retentionszeit.

Um die Verifizierung durch automatische Routinen zu gewährleisten, wurde zunächst innerhalb der NIST08 Datenbank (P.J. LINSTROM and W.G. MALLARD 2008) eine Korrelation aus Molekülmasse und entsprechender Retentionszeit für Substanzen einer bestimmten elementaren Zusammensetzung (CHNOS) bestimmt. Diese Korrelation umfasst mehr als 12.000 Substanzen mit ca. 65.000 Retentionszeiteinträgen. Anschließend wurde untersucht mittels welcher Parameter sich die Verteilungswolke am stärksten komprimieren lässt, um sie für ein Verifizierungskriterium nutzen zu können. Dabei stellte sich heraus, dass durch die Berücksichtigung des DBE-Wertes die engste Verteilung der Korrelation erreicht werden kann.

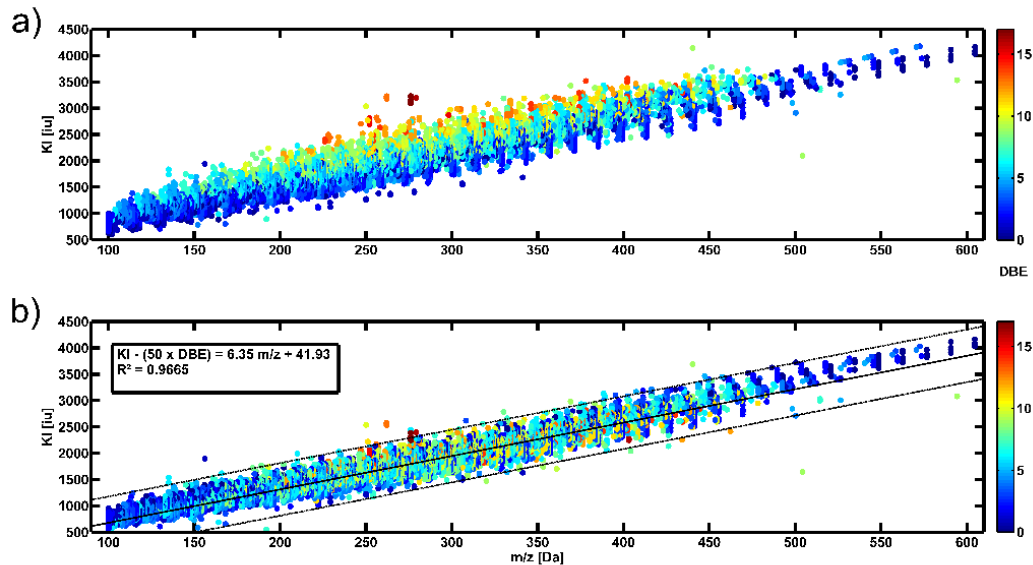


Abbildung 23 Korrelation der Molekülmasse mit dem Retentionsindex von ausgewählten Substanzen der NIST08 Datenbank mit der elementaren Zusammensetzung CHNOS (ungefähr 65.000 Einträge von 12.000 Substanzen); a) m/z vs. Kováts Index (KI) mit farblich kodiertem DBE Wert; b) DBE modifizierter KI mit linearer Regression und Konfidenzintervall mit 500 Index Einheiten, verwendet um Fehlzugeweisungen der Summenformeln zu identifizieren.

Streng genommen ist diese Korrelation nur für Petroleum-Proben anwendbar, die eine elementare Zusammensetzung von $C_cH_hN_nO_oS_s$ besitzen. Dies erfolgte in Übereinstimmung mit der gängigen Literatur (XU et al. 2013; MARSHALL and RODGERS 2004; MCKENNA et al. 2010; KLEIN et al. 2006; KIM and KIM 2010). Betrachtet man Proben mit zusätzlichen Elementen, verändert dies die Korrelation, da diese mitberücksichtigt werden müssen. Dabei gilt, je mehr Elemente berücksichtigt werden, desto größer ist das entsprechende Konfidenzintervall und desto weniger Summenformeln werden als Fehlzugeweisungen erkannt.

Für die durchgeführte Studie wurde ein Konfidenzintervall gewählt bei dem mehr als 99.9% der Datenpunkte innerhalb dieser Spanne liegen. Die entsprechende lineare Regression entspricht dem „vermutlichen Retentionsindex“ und lässt sich durch die folgende Gleichung beschreiben:

$$KI = 6,35 \text{ m/z} + 41,93 + (50 \cdot DBE) \quad (3.3)$$

Formel 8 Berechnung des DBE modifizierten "vermutlichen Retentionsindex"

So kann für jede elementare Zusammensetzung der Petroleum Probe, ein vermutlicher Retentionsindex (KI) errechnet und dieser mit dem Realen verglichen werden. Dadurch kann

ten bei den getesteten Proben (Leichtöl- und Schwerölfractionen sowie verschiedene Rohöle) 10 – 28% der detektierten Komponenten als nicht valide identifiziert und ausgeschlossen werden.

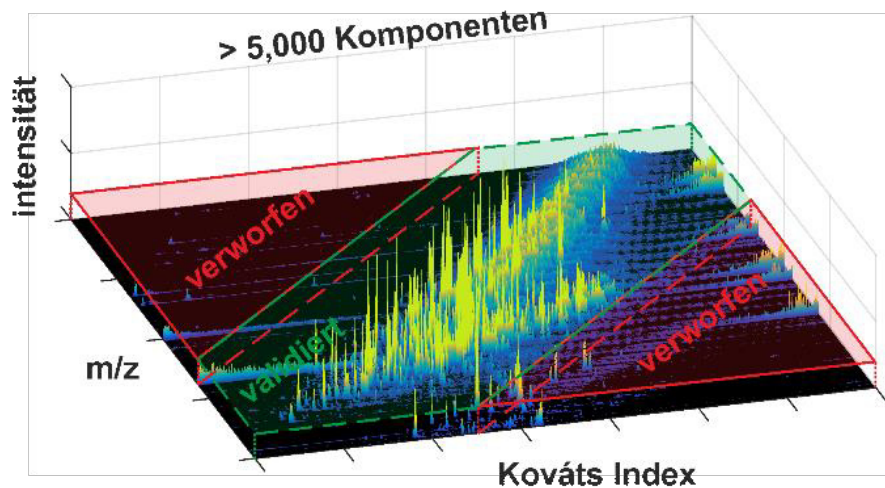


Abbildung 24 Chromatogramm eines Schweröls mit validiertem Bereich

Ein weiterer Vorteil der Routine besteht in der Evaluierung des Retentionsindex für jede elementare Zusammensetzung. Auch die Anzahl der möglichen Summenformeln pro m/z -Verhältnis kann reduziert werden. Das macht die Routine für die Auswertung von Daten, die mit einer Massengenauigkeiten größer als 1ppm aufgenommen wurden, interessant. In diesem Fall steigt zwar durch die schlechtere Massengenauigkeit ($> 1\text{ppm}$) die Anzahl der zuweisbaren möglichen Summenformeln an, diese lässt sich aber mittels zusätzlicher Validierung durch den Algorithmus erneut reduzieren.

Zusammengefasst nutzt die entwickelte Routine chromatographische Informationen um massenspektrometrische Daten zu evaluieren. Dabei ist eine genaue Massenauflösung Voraussetzung für die Routine. Durch die Kombination von grundlegenden Elementinformationen der Probe mit chromatographischen Informationen der Einzelsubstanzen, können die Validität und Verlässlichkeit der Datenauswertung durch Reduktion falsch zugewiesener Summenformeln verbessert werden.

3.5 Anwendung der GC-FT-ICR-MS zur Analyse von Bitumenalterung

Bitumen ist ein hoch komplexes Material, welches aus einer Vielzahl von Substanzen besteht. Die meisten sind langkettige Kohlenwasserstoffe, die zusätzlich Heteroatome wie Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel enthalten können. Auf Grund dieser komplexen Zusammensetzung konzentrieren sich die meisten Analysen von Bitumen auf physikochemische Eigenschaften wie Härte, Viskosität oder Sprödigkeit. Auf diesen Messwerten basieren auch die Klassifizierungen und Spezifikationen in der Industrie. Bitumen wird jährlich in einem Maßstab von über 100 Megatonnen in der Industrie verarbeitet, wovon 85% auf den Straßenbau entfallen. Die Alterung des Materials ist dabei ein essentieller und kritischer Faktor im Produkt-Lebenszyklus (LITKE et al. 1991; PETSCH et al. 2000; WEIGEL and STEPHAN 2017). Besonders die thermische und photochemische Oxidation, Verflüchtigung, Exsudation als auch die Zersetzung stellen bekannte Einflussfaktoren dar (BRANTHAVER et al. 1993; PETERSEN 2009; BAEK et al. 2012; ALHUMAIAN et al. 2016). Die komplexe Zusammensetzung mit mehr als 26.000 Einzelsubstanzen (KEKÄLÄINEN et al. 2013) macht die vollständige Isolierung aller Substanzen für herkömmliche Verfahren nahezu unmöglich. Der Einsatz der ultra-hochauflösenden Massenspektrometrie hat sich jedoch bereits vielfach bewährt (LESUEUR 2009; LEMKAU et al. 2014; HUBA and GARDINALI 2016; SMIT et al. 2015). Die Kopplung aus GC und HR-MS wurde eingesetzt, um herauszufinden welchen Einfluss Verflüchtigung von Substanzen auf die Zusammensetzung des Bitumens hat. Des Weiteren sollte diese Studie zeigen, ob eine Analyse von Bitumen mittels Gaschromatographie überhaupt möglich ist, auf Grund der hoch-viskosen, teerähnlichen Konsistenz. Die Weltgesundheitsorganisation hat bereits 2013 eine Studie (IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS 2013) in Auftrag gegeben, die ein höheres Risiko für Kanzerogenität bei oxidierten Bitumen feststellte. Daher ist eine mögliche Fragestellung, welche Stoffe können sich während des Oxidationsprozesses bilden und wie flüchtig sind diese Substanzen. Da neben der Verflüchtigung von Substanzen auch über andere Prozesse (z.B. Abrieb oder Verwitterung) partikuläres Material (Feinstaub) gebildet wird, sollte geklärt werden wie groß der tatsächliche Einfluss der Verflüchtigung ist. Der Einfluss von Aerosolpartikel wurde unter anderem von dem Helmholtz Virtual Institute of Complex Molecular Systems in Environmental Health (HICE) untersucht (STREIBEL 2017; KANASHOVA T. et al. 2018), um Rückschlüsse auf schadstoffbedingte Gesundheitsprobleme der Menschen zu ziehen.

Für die Studie wurde eine repräsentative Probe eines Bitumens der Sorte 70/100 verwendet. Ein Teil der Probe wurde mittels eines simulierten Alterungsprozesses oxidiert. Anschließend fanden eine Analyse und Datenauswertung des Ausgangsmaterials und des künstlich gealterten Materials statt. Dafür wurden sowohl Elementaranalysen wie auch Infrarotanalysen der Proben durchgeführt und zur Datenauswertung herangezogen. Dabei lieferte die Elementaranalyse einen anfänglichen Hinweis auf die Veränderung des Schwefelgehaltes in dem künstlich gealterten Material. Zusätzliche Informationen wurden anschließend mittels der GC-FT-ICRMS generiert. Der Vergleich der Hauptkomponentenklassen, wie er bei ultrahochauflösenden Datenauswertungen üblich ist, brachte zunächst keine grundlegenden Unterschiede zwischen der gealterten und der unbehandelten Probe zu Tage. Erst der Vergleich der relativen Intensitäten der detektierten Summenformeln machte deutlich, welche Verbindungen durch die künstliche Alterung beeinflusst wurden.

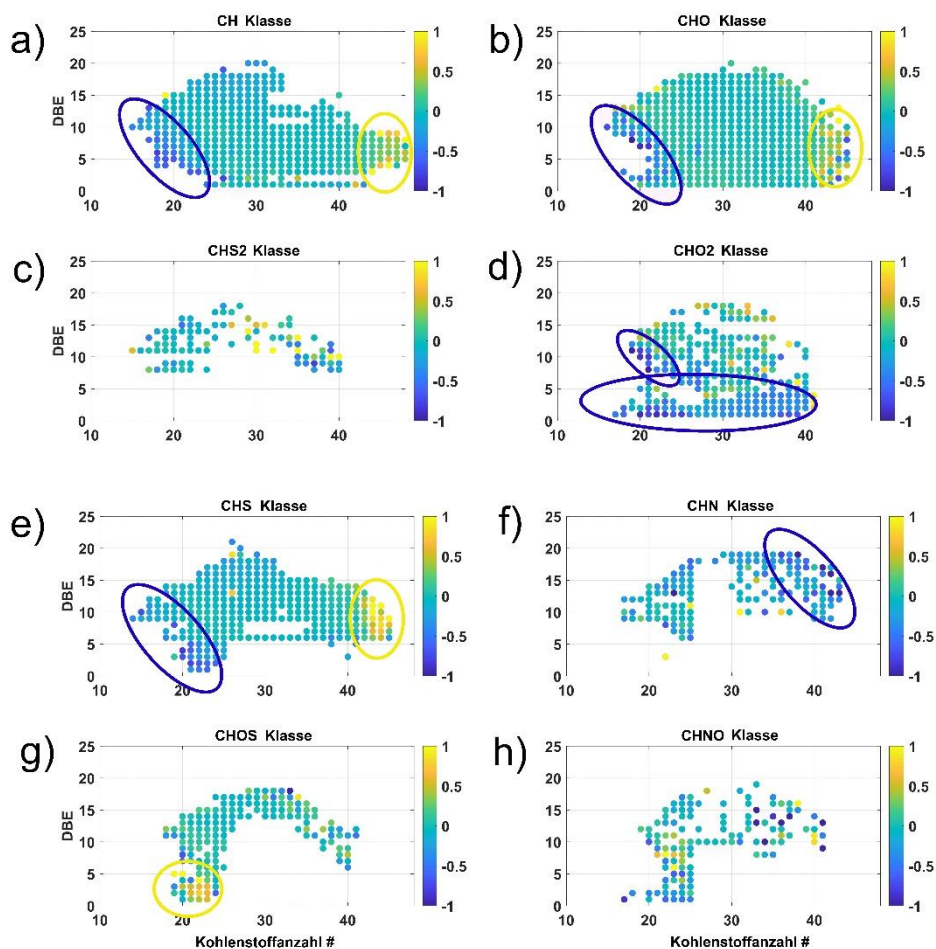


Abbildung 25 Komponentenklassendiagramme der zugewiesenen Summenformeln in ungealtertem und gealtertem Bitumen, mit Angabe des Verhältnisses ($[I_{\text{gealtert}} - I_{\text{ungealtert}}] / [I_{\text{ungealtert}} + I_{\text{gealtert}}]$) der normierten Intensitäten (auf Intensität der Standardsubstanz normiert); blaue

Ellipsen markieren Bereiche in denen Summenformeln im ungealtertem Bitumen intensiver sind und die gelben Ellipsen markieren Bereiche in denen im gealtertem Bitumen Summenformeln intensiver sind

Die Datenanalyse bestätigt vor allem eine verringerte Intensität der kleinsten und flüchtigsten Moleküle, mit weniger als 25 Kohlenstoffatomen pro Molekül, durch die künstliche Alterung. Zusätzlich kamen im Bereich hoher Molekülmassen, also an der oberen Detektionsgrenze, neue Verbindungen hinzu oder die Intensität wurde verstärkt. Die Verringerung der Intensitäten während der künstlichen Alterung ist sehr wahrscheinlich durch Verflüchtigung zu erklären, wie das folgende Bild darstellt.

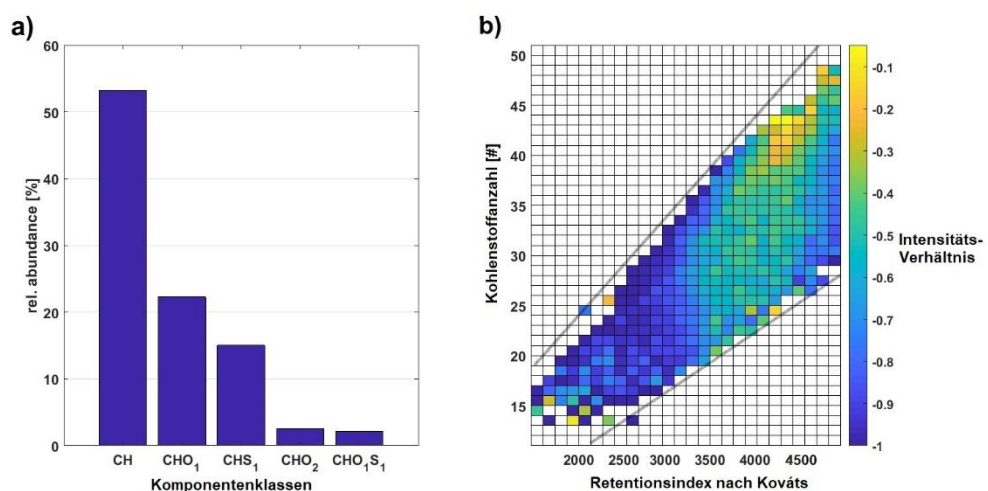


Abbildung 26 a) Komponentenklassendiagramm der Spezies in Bitumen, die durch die künstliche Alterung reduziert wurden; b) Retentionsindex vs. Kohlenstoffanzahl Diagramm der reduzierten Komponenten mit farblich kodiertem Intensitätsverhältnis ($[I_{\text{gealtert}} - I_{\text{ungealtert}}] / [I_{\text{ungealtert}} + I_{\text{gealtert}}]$)

Im rechten Diagramm der Abbildung 26 wird deutlich, dass vor allem Komponenten bis zu einem Retentionsindex von bis zu 3000 Indexeinheiten einer starken Reduktion unterliegen. Das entspricht etwa der Flüchtigkeit von n-Triacontan mit einem Siedepunkt von 452°C (LIDE 2008). Die Komponentenklassenverteilung zeigt, eine hohe Übereinstimmung in der Zusammensetzung der reduzierten Substanzen mit der Gesamtprobe. In Folge dessen liegt sehr wahrscheinlich kein selektiver Prozess zu Grunde, der für die Abschwächung der Intensität verantwortlich ist. Eher spricht diese Verteilung für eine Verflüchtigung der Substanzen im Probengemisch. Eine Komponentenklasse zeigt einen auffälligen Bereich unabhängig von dem oben beschriebenen Phänomen. Die Klasse der CHO₂-Komponenten zeigt für nahezu alle Spezies mit einem bis sechs Doppelbindungsäquivalenten eine Reduzierung der Intensität. Der Vergleich der Retentionsindizes mit Vergleichswerten aus der NIST Datenbank

ergab, dass es sich dabei um Karbonsäuremethylester handeln muss. Diese wurden während des Alterungsprozesses zwischen 20 und 70% reduziert. Da die betroffenen Karbonsäuremethylester auch die Funktion eines Weichmachers in dem Probenmaterial besitzen, nimmt durch die Alterung der Härtegrad und die Sprödigkeit des Bitumens zu. Bezüglich der Änderung des Schwefelgehaltes konnte die Analyse nur eine kleine Intensitätsverringering der Moleküle mit 15 – 25 Kohlenstoffatomen aufzeigen. Mit größter Wahrscheinlichkeit beruhen diese auf dem bereits oben beschriebenen Effekt der Verflüchtigung. Dennoch konnte ein Anstieg für Komponenten der CHOS-Klasse mit 20-25 Kohlenstoffatomen pro Molekül festgestellt werden. Nach Petersen et al. (PETERSEN et al. 1981) ist unbehandelter Bitumen praktisch frei von Sulfoxiden. Diese entstehen unmittelbar, sobald das Bitumen in Kontakt mit Sauerstoff oder Luft kommt. Da diese Sulfoxide aber bei thermischer Belastung beginnen können sich zu zersetzen (WALLING and BULLYKY 1964; HERRINGTON 1995), besteht die Vermutung, dass ein Teil der gebildeten Sulfoxide bereits der Zersetzung zum Opfer gefallen ist. Ein Entweichen von Schwefelwasserstoff nach einer thermischen Behandlung von Asphalt bereits ab 150°C konnte in einer Studie von Brandt und De Groot (BRANTHAVER et al. 1993; BRANDT, H., and P. DE GROOT 1996) belegt werden. Daher ist vermutlich die detektierte Differenz des Schwefelgehaltes in der Elementaranalyse auf die Verflüchtigung schwefelhaltiger Moleküle unterhalb der Detektionsgrenze ($m/z < 100$) zurückzuführen.

Die gebildeten Oxidationsprodukte beschränken sich hauptsächlich auf die Komponentenklassen CHO_2^- , CHO_1^- and CHN_1O_1 . Unter den ungefähr 2.000 detektierten Spezies machen diese aber nur einen Bruchteil aus. Trotzdem ist die Methode in der Lage einen Teil der im Bitumen enthaltenen Substanzen zu beschreiben. Durch die verwendete künstliche Alterung wurden zwar einige oxidierte Substanzen gebildet (z.B. Sulfoxide, Ketone, Carbonyle), es ließ sich aber keine Neubildung ganzer Substanzklassen mit der verwendeten Methode nachweisen. Daraus ergibt sich eine geringe Bildungsrate flüchtiger Verbindungen während der Alterung. Zwar verringern sich die Konzentrationen einiger Substanzen über den Lebenszyklus des Bitumens und verändern auch die physikochemischen Eigenschaften des gesamten Materials, aber die Auswertung der Studie legt den Schluss nahe, dass die schwer- und nichtflüchtigen Verbindungen im Bitumen (RÜGER et al. 2018; KÄFER et al. 2019) deutlichere Veränderungen durch die Alterung zeigen könnten.

4. Vor- und Nachteile der GC-APCI-FTICRMS Methode

An dieser Stelle möchte ich nochmal die Vor- und Nachteile der beschriebenen Methode zusammenfassen. Durch die Entwicklung einer Methode in der GC und FT-ICRMS mittels APCI gekoppelt werden, sind für die Untersuchung GC-gängiger Analyt Gemische Massenspektren mit extrem hoher Massenauflösung ($< 0.001 m/z$) und Massengenauigkeit ($< 1 \text{ ppm}$) möglich. Dadurch ist eine mathematische Berechnung von Summenformeln für jedes detektierte Masse-zu-Ladungsverhältnis möglich. Durch die Einbeziehung des Retentionsindexes in die Datenauswertung ist ein Abgleich von Analyten mit Retentionsdatenbanken möglich, was bisher für Massenspektren, die mittels weicher Ionisierung erzeugt wurden unmöglich war. So wird erstmals eine Verknüpfung zwischen bestimmten Analyt-Signalen und Retentionsdatenbankeinträgen für eine GC-APCI Methode geschaffen. Zusätzlich wird dadurch auch die Möglichkeit der Evaluierung für zugewiesene Summenformeln eröffnet. Der etablierte Weg um eindeutige Summenformelzuweisungen zu generieren, besteht in der Definition eines möglichst kleinen Toleranzintervalls ($< 0.0003 m/z$). Dieses wiederum wird maßgeblich durch die Massengenauigkeit beeinflusst und ist damit ein Instrument-spezifischer Wert. Durch die Evaluierung der Summenformeln mittels Retentionsindex können selbst für Instrumente mit einer schlechteren Massengenauigkeit noch eindeutige Summenformelzuweisungen generiert werden. Die entwickelten Prozessierungsroutinen machen auch eine automatisch die Zuweisungen der Summenformeln, Evaluierung der Signale und statistische Datenanalysen, sowie individuelle Anpassungen der Datenauswertung an jede Probenmatrix möglich. Außerdem kann durch die Variation der Ionisierungsquelle die Selektivität und Empfindlichkeit der Methode verändert werden. Die Anwendung der Methode auf alternative, weiche Ionisierungsquellen wie APPI oder APLI ist ohne größeren Aufwand möglich.

Natürlich birgt die Verwendung von weichen Ionisierungsquellen auch Nachteile. So sind leider nicht alle Substanzklassen für alle Ionisierungen zugänglich. Außerdem variiert die Ionisierungseffizienz unter den Substanzen. Dadurch sind aufgenommene Massenspektren von verschiedenen Systemen schlecht vergleichbar. Zusätzlich können durch konkurrierende Reaktionen während der Ionisierung auch Artefakte wie Addukte oder Fragmente auftreten. Im Unterschied zu der Fragmentierung bei der Elektronenstoßionisierung sind diese aber nicht quantitativ reproduzierbar. Jedoch korrelieren die Acquisitionszykluszeiten bei

den FT-ICRMS Geräten direkt mit der Massenauflösung. Daraus folgt, je höher die Massenauflösung der Spektren sein soll, desto länger sind auch die Acquisitionszykluszeiten. Auf Grund des Auftretens sehr schmaler Peakbreiten von < 1 s wird die gaschromatographische Peakauflösung trotz Verbesserung noch immer gestört. Dabei nimmt beim FT-ICRMS im Vergleich zum hochauflösenden Flugzeitmassenspektrometer (HRTOF-MS) leider auch die maximale Massenauflösung zu höheren m/z -Verhältnissen hin ab (LossL et al. 2014).

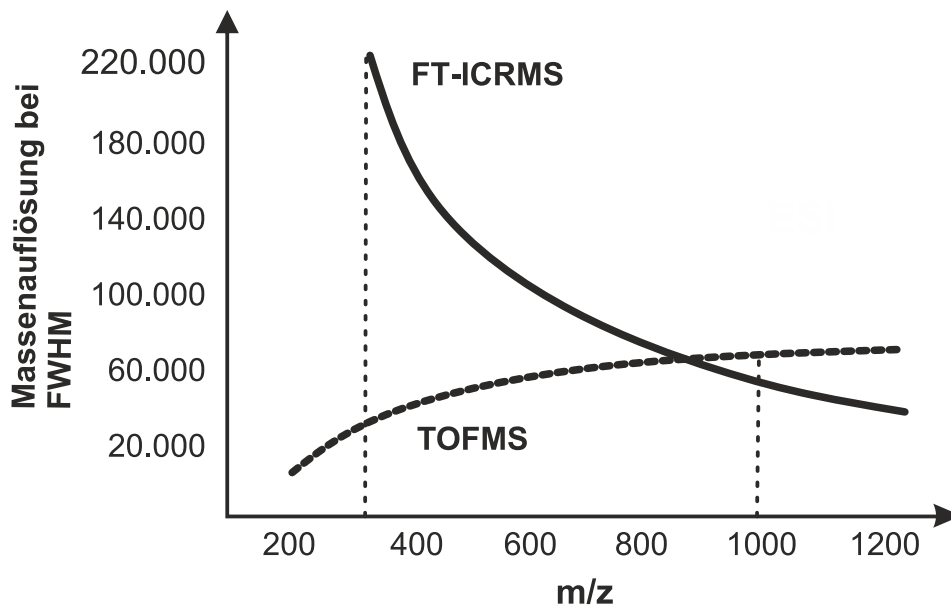


Abbildung 27 Vergleich Massenauflösung zwischen HRTOF und HR-MS

Die Rohdaten der MS Spektren speziell für chromatographische Trennungen sind auf Grund der ungeheuren Datenpunktzahl pro Spektrum enorm. Der Speicherbedarf kann sehr schnell die Gigabyte-Grenze überschreiten, was die langfristige Speicherung der Rohdaten enorm schwierig macht. Die großen Datenmengen haben aber noch einen weiteren Nachteil, die Prozessierung dauert dementsprechend auch länger. So kann selbst bei der Verwendung der automatisierten Prozessierungsroutinen dieser Vorgang über eine Stunde pro Chromatogramm benötigen. Zudem setzt die Zuweisung der Summenformeln auch ein Vorwissen über die elementare Zusammensetzung der Probe voraus, da ansonsten die Anzahl möglicher Summenformeln, falls alle Elemente berücksichtigt werden müssten, enorm ansteige (siehe Abbildung 14).

Nichtsdestotrotz bietet diese Technik einmalige Einblicke in die elementare Zusammensetzung von Proben und bietet gleichzeitig die Vorzüge der gaschromatographischen Trennung.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der dargelegten Dissertation wird die Entwicklung und Optimierung einer Analysemethode für Gaschromatographie gekoppelt mit chemischer Ionisierung unter Atmosphärendruck und einem Fourier Transformation Ionen Zyklotron Resonanz Massenspektrometers präsentiert. Dabei werden sowohl einzelne Anwendungsgebiete wie auch Vor- und Nachteile der Methode dargestellt.

Nach dem Aufbau der Kopplung und Entwicklung einer funktionsfähigen Analysemethode, lag der anfängliche Fokus auf dem Austesten der Grenzwerte der Apparatur. Durch die genutzte Systemkonfiguration ist es möglich den Gaschromatographen mit Flussraten deutlich über dem Van-Deemter Optimum zu verwenden, was bei den herkömmlich verwendeten Vakuumionisierungsquellen ausgeschlossen ist. Anschließend wurde die entwickelte Analysemethode erstmals für die Charakterisierung von unbekannten Verunreinigungen und Intermediaten im Heroin-Herstellungsprozess angewendet (Publikation eins). Anschließend wurde die automatische Datenauswertung implementiert und optimiert durch die Verwendung des Retentionsindexes zur Evaluierung zugewiesener Summenformeln (Publikation zwei). Daraufhin wurde mit der Methode die Alterung von Bitumen erforscht, und evaluiert in wie weit semi- und schwerflüchtige Substanzen mit der Analysemethode untersucht und erfasst werden können (Publikation drei).

Ultra-hochauflösenden MS ist die Methode der Wahl, wenn es um die Analyse komplexer Probenmatrizes geht, da sie die gleichzeitige Charakterisierung mehrerer tausend Summenformeln und somit die Analyse der Probe auf elementarer Ebene erlaubt. Durch die Kombination verschiedener Ionisierungsquellen mit der GC-FT-ICR MS bietet sich die Möglichkeit aus verschiedenen Blickwinkeln auf eine Probe zu schauen und selektiv bestimmte Substanzen zu betrachten. Gleichzeitig kann die Methode noch mit weiteren Techniken wie Dissoziation kombiniert werden, um noch mehr Informationen über Proben zu gewinnen. Im Laufe der Zeit hat sich die ultra-hochauflösende Massenspektrometrie immer mehr etabliert und findet deshalb in immer mehr Untersuchungsfeldern Anwendung. Zwar wird die beschriebene Technik mittels GC-APCI-FT-ICRMS nie eine für die breite Masse zugängliche Analysenmethode werden, trotzdem zeigt diese Methode das große Potential der ultra-hochauflösenden Massenspektrometrie und ihre vielfältigen Kopplungsmöglichkeiten.

6. Literaturverzeichnis

- AlHumaidan, Faisal S.; Hauser, Andre; Rana, Mohan S.; Lababidi, Haitham M. S. (2016): Impact of Thermal Treatment on Asphaltene Functional Groups. In *Energy Fuels* 30 (4), pp. 2892–2903. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.6b00261.
- Allen, Andrew C.; Cooper, Donald A.; Moore, James M.; Gloger, Manfred.; Neumann, Helmut. (1984a): Illicit heroin manufacturing by-products: capillary gas chromatographic determination and structural elucidation of narcotine- and norlaudanosi- related compounds. In *Analytical Chemistry* 56 (14), pp. 2940–2947. DOI: 10.1021/ac00278a072.
- Allen, Andrew C.; Cooper, Donald A.; Moore, James M.; Teer, Charles B. (1984b): Theba- line rearrangements: nonclassical D ring migrations. In *The Journal of Organic Chemis- try* 49 (19), pp. 3462–3465.
- Amundson, Lucas M.; Gallardo, Vanessa A.; Vinueza, Nelson R.; Owen, Benjamin C.; Reece, Jennifer N.; Habicht, Steven C. et al. (2012): Identification and Counting of Ox- ygen Functionalities and Alkyl Groups of Aromatic Analytes in Mixtures by Positive- Mode Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry Coupled with High-Performance Liquid Chromatography. In *Energy Fuels* 26 (5), pp. 2975– 2989. DOI: 10.1021/ef2019098.
- aprentas (Ed.) (2017): Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden. Cham: Springer Interna- tional Publishing.
- Babushok, V. I.; Linstrom, P. J. (2004): On the Relationship Between Kováts and Lee Re- tention Indices. In *Chromatographia* 60 (11), pp. 725–728. DOI: 10.1365/s10337-004- 0450-2.
- Baek, Cheolmin; Underwood, B.; Kim, Y. (2012): Effects of Oxidative Aging on Asphalt Mixture Properties. In *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board* 2296, pp. 77–85. DOI: 10.3141/2296-08.
- Baldeschieler, J.D. (1968): Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy: Cyclotron double resonance provides a new technique for the study of ion-molecule reaction mecha- nisms. In *Science*; 159 (3812):263-73
- Ballesteros-Gómez, A.; Boer, J. de; Leonards, P.E.G. (2013): Novel analytical methods for flame retardants and plasticizers based on gas chromatography, comprehensive two-

- dimensional gas chromatography, and direct probe coupled to atmospheric pressure chemical ionization-high resolution time-of-flight-mass spectrometry. In *Anal. Chem.* 85 (20), pp. 9572–9580. DOI: 10.1021/ac4017314.
- Barrow, M. P.; Peru, K. M.; Headley, J. V. (2014): An added dimension: GC atmospheric pressure chemical ionization FTICR MS and the athabasca oil sands. In *Anal. Chem.* 86 (16), pp. 8281–8288. DOI: 10.1021/ac501710y.
- Bendig, P.; Vetter, W. (2013): Improved GC/ECNI-MS sensitivity of decabromodiphenyl ether determination on 30 m columns by increasing the carrier gas flow after a modified gel permeation chromatographic cleanup protocol employing cyclohexane/ethyl acetate as eluent. In *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 93 (9), pp. 1019–1029. DOI: 10.1080/03067319.2012.690150.
- Brandt, H., and P. De Groot (Ed.) (1996): Emission and composition of fumes from current bitumen types. EURASPHALT & EUROBITUME CONGRESS, STRASBOURG, 7-10 MAY 1996. VOLUME 1. PAPER E&E. 2.026.
- Branthaver, J. F.; Petersen, J. Claine; Robertson, R. E.; Duvall, J. J.; Kim, S. S.; Harnsberger, P. M. et al. (1993): Binder characterization and evaluation. Volume 2: Chemistry SHRP-A-368. Washington DC: National Research Council. With assistance of Strategic Highway Research Program. National Academy of Sciences.
- Bristow, T.; Harrison, M.; Sims, M. (2010): The application of gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation time-of-flight mass spectrometry to impurity identification in pharmaceutical development. In *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (11), pp. 1673–1681. DOI: 10.1002/rcm.4557.
- Bruker Daltonics (2017): technical details of solariX XR. eXtreme Resolution for a Wide Variety of Analytical Workflows. Bruker Daltonics. Homepage. Available online at <https://www.bruker.com/de/products/mass-spectrometry-and-separations/ftms/solariX/technical-details.html>, updated on 2017, checked on 9/26/2017.
- Brunnée, Curt (1987): The ideal mass analyzer. Fact or fiction? In *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 76 (2), pp. 125–237. DOI: 10.1016/0168-1176(87)80030-7.
- Cammann, Karl (2001): Instrumentelle Analytische Chemie. Verfahren, Anwendung und Qualitätssicherung. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.

- Carrasco-Pancorbo, A.; Nevedomskaya, E.; Arthen-Engeland, T.; Zey, T.; Zurek, G.; Baesmann, C. et al. (2009): Gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-time of flight mass spectrometry: Analytical validation and applicability to metabolic profiling. In *Anal. Chem.* 81 (24), pp. 10071–10079. DOI: 10.1021/ac9006073.
- Castello, Gianrico (1999): Retention index systems: alternatives to the n-alkanes as calibration standards. In *Journal of Chromatography A* 842 (1), pp. 51–64. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00989-3.
- Comisarow, M.B.; Marshall, Alan G. (1974): Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical Physics Letters* ;25(2):282–3.
- Comisarow, M.B.; Marshall, Alan G. (1974): Frequency-sweep fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical Physics Letters* ;26(4):489–90.
- Dagan, Shai; Amirav, Aviv (1994): Fast, high temperature and thermolabile GC—MS in supersonic molecular beams. In *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 133 (2-3), pp. 187–210. DOI: 10.1016/0168-1176(94)03960-7.
- David, F.; Dunkle, M.; Tienpont, B.; Mitsui, K.; Ochiai, N.; Sasamoto, K. et al. (2013): Gas chromatography with soft ionization mass spectrometry for the characterization of natural products. In *LC-GC Eur.* 26 (10), pp. 548–556.
- Debrus, B.; Broséus, J.; Guillarme, D.; Lebrun, P.; Hubert, P.; Veuthey, J.-L. et al. (2011): Innovative methodology to transfer conventional GC-MS heroin profiling to UHPLC-MS/MS. In *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (8), pp. 2719–2730. DOI: 10.1007/s00216-010-4282-7.
- Dorfner, Ralph; Ferge, Thomas; Yeretdzian, Chahan; Kettrup, Antonius; Zimmermann, Ralf (2004): Laser Mass Spectrometry as On-Line Sensor for Industrial Process Analysis: Process Control of Coffee Roasting. In *Analytical Chemistry* 76 (5), pp. 1386–1402. DOI: 10.1021/ac034758n.
- Gaspar, A.; Zellermann, E.; Lababidi, S.; Reece, J.; Schrader, W. (2012): Impact of different ionization methods on the molecular assignments of asphaltenes by FT-ICR mass spectrometry. In *Anal. Chem.* 84 (12), pp. 5257–5267. DOI: 10.1021/ac300133p.
- Ghislain, Thierry; Faure, Pierre; Michels, Raymond (2012): Detection and Monitoring of PAH and Oxy-PAHs by High Resolution Mass Spectrometry: Comparison of ESI, APCI and APPI Source Detection. In *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23 (3), pp. 530–536. DOI: 10.1007/s13361-011-0304-8.

- Gross, Jürgen H. (2013): Massenspektrometrie. In *Ein Lehrbuch*. Berlin: Springer Spektrum. S 260, p. 414.
- Guilhaus, Michael (1995): Special feature. Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts. In *J. Mass Spectrom.* 30 (11), pp. 1519–1532. DOI: 10.1002/jms.1190301102.
- Herrera, Lisandra Cubero; Grossert, J. Stuart; Ramaley, Louis (2008): Quantitative aspects of and ionization mechanisms in positive-ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. In *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (12), pp. 1926–1941. DOI: 10.1016/j.jasms.2008.07.016.
- Herrington, Philip R. (1995): Thermal decomposition of asphalt sulfoxides. In *Fuel* 74 (8), pp. 1232–1235. DOI: 10.1016/0016-2361(95)00039-8.
- Hertkorn, N.; Frommberger, M.; Witt, M.; Koch, B. P.; Schmitt-Kopplin, Ph.; Perdue, E. M. (2008): Natural organic matter and the event horizon of mass spectrometry. In *Anal. Chem.* 80 (23), pp. 8908–8919. DOI: 10.1021/ac800464g.
- Hiller, Karsten; Hangebrauk, Jasper; Jäger, Christian; Spura, Jana; Schreiber, Kerstin; Schomburg, Dietmar (2009): MetaboliteDetector: Comprehensive Analysis Tool for Targeted and Nontargeted GC/MS Based Metabolome Analysis. In *Analytical Chemistry* 81 (9), pp. 3429–3439. DOI: 10.1021/ac802689c.
- Holmes, J. C.; Morrell, F. A. (1957): Oscillographic Mass Spectrometric Monitoring of Gas Chromatography. In *Applied Spectroscopy* 11 (2), pp. 86–87. DOI: 10.1366/000370257774633394.
- Horning, E. C.; Horning, M.G; Carrol, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N. (1973): New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. In *Anal. Chem.* 45 (6), pp. 936–943.
- Huba, Anna Katarina; Gardinali, Piero R. (2016): Characterization of a crude oil weathering series by ultrahigh-resolution mass spectrometry using multiple ionization modes. In *The Science of the total environment* 563-564, pp. 600–610. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.233.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; World Health Organization; International Agency for Research on Cancer (2013): Bitumens and bitumen emissions, and some N- and S-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons.

- Lyon: IARC Press (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 103).
- James, A. T.; Martin, A. J. P. (1952): Gas-liquid partition chromatography. A technique for the analysis of volatile materials. In *Analyst* 77 (921), p. 915. DOI: 10.1039/AN9527700915.
- Jonathan, Amster I. (1996): Fourier Transform Mass Spectrometry. In *J. Mass Spectrom.* ;31(12):1325–37.
- Käfer, Uwe; Gröger, Thomas; Rüger, Christopher P.; Czech, Hendryk; Saraji-Bozorgzad, Mohammad; Wilharm, Thomas; Zimmermann, Ralf (2019): Direct inlet probe – High-resolution time-of-flight mass spectrometry as fast technique for the chemical description of complex high-boiling samples. In *Talanta* 202, pp. 308–316. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.05.030.
- Kanashova T. et al. (2018): Emissions from a modern log wood masonry heater and wood pellet boiler: Composition and biological impact on air-liquid interface exposed human lung cancer cells. In *Journal of Molecular and Clinical Medicine* 1 (1), pp. 23–35. DOI: 10.31083/j.jmcm.2018.01.004.
- Kekäläinen, Timo; Pakarinen, Jaana M. H.; Wickström, Kim; Lobodin, Vladislav V.; McKenna, Amy M.; Jänis, Janne (2013): Compositional Analysis of Oil Residues by Ultrahigh-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. In *Energy Fuels* 27 (4), pp. 2002–2009. DOI: 10.1021/ef301762v.
- Kim, Young Hwan; Kim, Sunghwan (2010): Improved abundance sensitivity of molecular ions in positive-ion APCI MS analysis of petroleum in toluene. In *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21 (3), pp. 386–392. DOI: 10.1016/j.jasms.2009.11.001.
- Kind, Tobias; Fiehn, Oliver (2007): Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. In *BMC bioinformatics* 8, p. 105. DOI: 10.1186/1471-2105-8-105.
- Klein, G. C.; Kim, S.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.; Yen, A. (2006): Mass spectral analysis of asphaltenes. II. Detailed compositional comparison of asphaltenes deposit to its crude oil counterpart for two geographically different crude oils by ESI FT-ICR MS. In *Energy Fuels* 20 (5), pp. 1973–1979. DOI: 10.1021/ef0600208.

- Koch, Boris P.; Dittmar, Thorsten; Witt, Matthias; Kattner, Gerhard (2007): Fundamentals of molecular formula assignment to ultrahigh resolution mass data of natural organic matter. In *Anal. Chem.* 79 (4), pp. 1758–1763. DOI: 10.1021/ac061949s.
- Kováts, E. (1958): Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1. Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. In *Helvetica Chimica Acta* 41 (7), pp. 1915–1932.
- Lee, Milton L.; Vassilaros, Daniel L.; White, Curt M. (1979): Retention indices for programmed-temperature capillary-column gas chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Anal. Chem.* 51 (6), pp. 768–773. DOI: 10.1021/ac50042a043.
- Lemkau, Karin L.; McKenna, Amy M.; Podgorski, David C.; Rodgers, Ryan P.; Reddy, Christopher M. (2014): Molecular evidence of heavy-oil weathering following the M/V Cosco Busan spill: insights from Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. In *Environmental science & technology* 48 (7), pp. 3760–3767. DOI: 10.1021/es403787u.
- Lesueur, D. (2009): The colloidal structure of bitumen: Consequences on the rheology and on the mechanisms of bitumen modification. In *Adv Colloid Interface Sci* 145 (1-2), pp. 42–82. DOI: 10.1016/j.cis.2008.08.011.
- Li, Du-Xin; Gan, Lin; Bronja, Amela; Schmitz, Oliver J. (2015): Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. In *Anal. Chim. Acta* 891, pp. 43–61. DOI: 10.1016/j.aca.2015.08.002.
- Lide, D. R. (2008): CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition: Taylor & Francis. Available online at <https://books.google.de/books?id=KACWPwAACAAJ>.
- Littke, R.; Klusmann, U.; Krooss, B.; Leythaeuser, D. (1991): Quantification of loss of calcite, pyrite, and organic matter due to weathering of Toarcian black shales and effects on kerogen and bitumen characteristics. In *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55 (11), pp. 3369–3378. DOI: 10.1016/0016-7037(91)90494-P.
- Lossl, Philip; Snijder, Joost; Heck, Albert (2014): Boundaries of Mass Resolution in Native Mass Spectrometry. In *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 25. DOI: 10.1007/s13361-014-0874-3.

- Lurie, Ira S.; Driscoll, Sara E.; Cathapermal, Sam S.; Panicker, Sini (2013): Determination of heroin and basic impurities for drug profiling by ultra-high-pressure liquid chromatography. In *Forensic Science International* 231 (1), pp. 300–305. DOI: 10.1016/j.forensiint.2013.06.008.
- Lurie, Ira S.; Toske, Steven G. (2008): Applicability of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for heroin profiling. In *Journal of Chromatography A* 1188 (2), pp. 322–326. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.03.011.
- Mann, Matthias; Kelleher, Neil L. (2008): Precision proteomics. The case for high resolution and high mass accuracy. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (47), pp. 18132–18138. DOI: 10.1073/pnas.0800788105.
- Makarov, A. (2000): Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. In *Anal. Chem.*;72(6):1156–62.
- Marshall, Alan G., Hendrickson CL, Jackson GS. (1998): Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. In *Mass Spectrom. Rev.* 17(1):1–35
- Marshall, Alan G.; Rodgers, Ryan P. (2004): Petroleomics. The next grand challenge for chemical analysis. In *Accounts of Chemical Research* 37 (1), pp. 53–59.
- Marshall, Alan G. (2000): Milestones in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry technique development. In *International Journal of Mass Spectrometry* ;200(1-3):331–56
- McEwen, Charles N.; Larsen, Barbara S. (2009): Ionization mechanisms related to negative Ion APPI, APCI, and DART. In *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (8), pp. 1518–1521. DOI: 10.1016/j.jasms.2009.04.010.
- McKenna, Amy M.; Purcell, Jeremiah M.; Rodgers, Ryan P.; Marshall, Alan G. (2010): Heavy Petroleum Composition. 1. Exhaustive Compositional Analysis of Athabasca Bitumen HVGO Distillates by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. A Definitive Test of the Boduszynski Model. In *Energy Fuels* 24 (5), pp. 2929–2938. DOI: 10.1021/ef100149n.
- McLafferty, F. W. (1956): Mass Spectrometric Analysis Broad Applicability to Chemical Research. In *Analytical Chemistry* 28 (3), pp. 306–316. DOI: 10.1021/ac60111a005.
- McLafferty, F. W. (1959): Mass Spectrometric Analysis. Molecular Rearrangements. In *Analytical Chemistry* 31 (1), pp. 82–87. DOI: 10.1021/ac60145a015.

- Morello, David R.; Cooper, Sam D.; Panicker, Sini; Casale, John F. (2010): Signature Profiling and Classification of Illicit Heroin by GC-MS Analysis of Acidic and Neutral Manufacturing Impurities. In *Journal of Forensic Sciences* 55 (1), pp. 42–49. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2009.01220.x.
- Neumann, H.; Gloger, M. (1982): Profiling of illicit heroin samples by high-resolution capillary gas chromatography for forensic application. In *Chromatographia* 16 (1), pp. 261–264. DOI: 10.1007/BF02258915.
- P.J. Linstrom and W.G. Mallard (2008): NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database. NIST MS Spectral Library, Tandem and RI. Version 2008: National Institute of Standards and Technology. Available online at <http://chemdata.nist.gov>.
- Pellegrin, Valdo (1983): Molecular formulas of organic compounds: the nitrogen rule and degree of unsaturation. In *Journal of Chemical Education* 60 (8), p. 626.
- Petersen, J. C.; Dorrence, S. M.; Nazir, M.; Plancher, H.; Barbour, F. A. (Eds.) (1981): Oxidation of sulfur compounds in petroleum residues: reactivity-structural relationships. National American Chemical Society summer meeting. New York, USA, 23 Aug 1981. Laramie Energy Technology Center, WY. CONF-810813-(Vol.2). Am. Chem. Soc., Div. Pet. Chem., checked on 9/1/1981.
- Petersen, J. Claine (2009): A Review of the Fundamentals of Asphalt Oxidation: Chemical, Physicochemical, Physical Property, and Durability Relationships. Washington, D.C.: Transportation Research Board.
- Petsch, S.T; Berner, R.A; Eglinton, T.I (2000): A field study of the chemical weathering of ancient sedimentary organic matter. In *Org. Geochem.* 31 (5), pp. 475–487. DOI: 10.1016/S0146-6380(00)00014-0.
- Portolés, T.; Mol, J.G.J.; Sancho, J. V.; Hernández, F. (2012): Advantages of atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography tandem mass spectrometry: Pyrethroid insecticides as a case study. In *Anal. Chem.* 84 (22), pp. 9802–9810. DOI: 10.1021/ac301699c.
- Portolés, T.; Mol, J.G.J.; Sancho, J. V.; Hernández, F. (2014): Use of electron ionization and atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for screening and identification of organic pollutants in waters. In *J. CHROMATOGR. A* 1339, pp. 145–153. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.03.001.

- Portolés, T.; Sancho, J. V.; Hernández, F.; Newton, A.; Hancock, P. (2010): Potential of atmospheric pressure chemical ionization source in GC-QTOF MS for pesticide residue analysis. In *J. Mass Spectrom.* 45 (8), pp. 926–936. DOI: 10.1002/jms.1784.
- Raro, M.; Portolés, T.; Pitarch, E.; Sancho, J. V.; Hernández, F.; Garrosta, L. et al. (2016): Potential of atmospheric pressure chemical ionization source in gas chromatography tandem mass spectrometry for the screening of urinary exogenous androgenic anabolic steroids. In *Anal. Chim. Acta* 906, pp. 128–138. DOI: 10.1016/j.aca.2015.11.041.
- Reemtsma, Thorsten (2009): Determination of molecular formulas of natural organic matter molecules by (ultra-) high-resolution mass spectrometry. Status and needs. In *Journal of chromatography. A* 1216 (18), pp. 3687–3701. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.02.033.
- Rüger, Christopher P.; Grimmer, Christoph; Sklorz, Martin; Neumann, Anika; Streibel, Thorsten; Zimmermann, Ralf (2018): Combination of Different Thermal Analysis Methods Coupled to Mass Spectrometry for the Analysis of Asphaltenes and Their Parent Crude Oils: Comprehensive Characterization of the Molecular Pyrolysis Pattern. In *Energy Fuels* 32 (3), pp. 2699–2711. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.7b02762.
- Schauer, Nicolas; Steinhauser, Dirk; Strelkov, Sergej; Schomburg, Dietmar; Allison, Gordon; Moritz, Thomas et al. (2005): GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. In *FEBS Letters* 579 (6), pp. 1332–1337. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.01.029.
- Schiewek, R.; Lorenz, M.; Giese, R.; Brockmann, K.; Benter, T.; Gäb, S.; Schmitz, O. J. (2008): Development of a multipurpose ion source for LC-MS and GC-API MS. In *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (1-2), pp. 87–96. DOI: 10.1007/s00216-008-2255-x.
- Schweikhard, L.; Marshall, Alan G. (1993): Excitation modes for fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. In *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4(6), 433-52
- Schwemer, T.; Rüger, C. P.; Sklorz, M.; Zimmermann, R. (2015): Gas Chromatography Coupled to Atmospheric Pressure Chemical Ionization FT-ICR Mass Spectrometry for Improvement of Data Reliability. In *Anal. Chem.* 87 (24), pp. 11957–11961. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02114.
- Scigelova, Michaela; Hornshaw, Martin; Giannakopoulos, Anastassios; Makarov, Alexander (2011): Fourier transform mass spectrometry. In *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10 (7), M111.009431. DOI: 10.1074/mcp.M111.009431.

- Skoog, Douglas A.; Holler, F. James; Crouch, Stanley R. (2007): Instrumental analysis: Brooks/Cole, Cengage Learning Belmont.
- Smit, Elize; Rüger, Christopher P.; Sklorz, Martin; Goede, Stefan de; Zimmermann, Ralf; Rohwer, Egmont R. (2015): Investigating the Trace Polar Species Present in Diesel Using High-Resolution Mass Spectrometry and Selective Ionization Techniques. In *Energy Fuels* 29 (9), pp. 5554–5562. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.5b00831.
- Smith, L.G. (1951): A new magnetic period mass spectrometer. In *Review of Scientific Instruments*; 22(2), 115-6
- Sommer, H.; Thomas, H.A.; Hipple, J.A. (1951): The measurement of eM by cyclotron resonance. In *Phys. Rev.*; 82(5), pp. 697-702
- Strehmel, N.; Kopka, J.; Scheel, D.; Böttcher, C. (2014): Annotating unknown components from GC/ESI-MS-based metabolite profiling experiments using GC/APCI(+)-QTOFMS. In *Metabolomics* 10 (2), pp. 324–336. DOI: 10.1007/s11306-013-0569-y.
- Streibel, Thorsten et al. (2017): Aerosol emissions of a ship diesel engine operated with diesel fuel or heavy fuel oil. In *Environmental Science and Pollution Research* 24 (12), pp. 10976–10991. DOI: 10.1007/s11356-016-6724-z.
- Strömberg, L.; Lundberg, L.; Neumann, H.; Bobon, B.; Huizer, H.; van der Stelt, N.W (2000): Heroin impurity profiling: A harmonization study for retrospective comparisons. In *Forensic Science International* 114 (2), pp. 67–88. DOI: 10.1016/S0379-0738(00)00295-4.
- Toske, Steven G.; Cooper, Samuel D.; Morello, David R.; Hays, Patrick A.; Casale, John F.; Casale, Ellen (2006): Neutral Heroin Impurities from Tetrahydrobenzylisoquinoline Alkaloids. In *Journal of Forensic Sciences* 51 (2), pp. 308–320. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2006.00057.x.
- Tretyakova, Natalia; Goggin, Melissa; Sangaraju, Dewakar; Janis, Gregory (2012): Quantitation of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry. In *Chemical research in toxicology* 25 (10), pp. 2007–2035. DOI: 10.1021/tx3002548.
- United Nations Office of Drugs and Crime (1998): Recommended methods for testing opium, morphine and heroin: manual for use by national drug testing laboratories: United Nations Vienna.

- United Nations Office on Drugs; Crime (2003): The opium economy in Afghanistan: an international problem: United Nations Publications.
- United States of America (1987): Clandestine Manufacture of Substances Under International Control: Manual for Use by National Law Enforcement Authorities and Personnel of Narcotics Laboratories.
- van Deemter, J. J.; Zuiderweg, F. J.; Klinkenberg, A. (1956): Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. In *Chemical Engineering Science* 5 (6), pp. 271–289. DOI: 10.1016/0009-2509(56)80003-1.
- Vassilaros, Daniel L.; Kong, Robert C.; Later, Douglas W.; Lee, Milton L. (1982): Linear retention index system for polycyclic aromatic compounds: Critical evaluation and additional indices. In *J. CHROMATOGR. A* 252, pp. 1–20. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)88394-1.
- Wachsmuth, C. J.; Hahn, T. A.; Oefner, P. J.; Dettmer, K. (2015): Enhanced metabolite profiling using a redesigned atmospheric pressure chemical ionization source for gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015.
- Wachsmuth, Christian J.; Almstetter, Martin F.; Waldhier, Magdalena C.; Gruber, Michael A.; Nürnberger, Nadine; Oefner, Peter J.; Dettmer, Katja (2011): Performance Evaluation of Gas Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry for Metabolic Fingerprinting and Profiling. In *Analytical Chemistry* 83 (19), pp. 7514–7522. DOI: 10.1021/ac201719d.
- Walling, C.; Bullyky, J. (1964): Thermal Decomposition of Sulfoxides. In *J. Org. Chem.* 29, pp. 2699–2703.
- Weigel, S.; Stephan, D. (2017): Modelling of rheological and ageing properties of bitumen based on its chemical structure. In *Mater Struct* 50 (1). DOI: 10.1617/s11527-016-0957-7.
- Xu, C.-M.; Liu, Y.; Zhao, S.-Q.; Shi, Q. (2013): Compositional analysis of petroleum asphaltenes by negative ion electrospray high resolution FT-ICR mass spectrometry. In *Zhongguo Shiyou Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban)* 37 (5), pp. 190–195. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5005.2013.05.028.

Zimmermann, Ralf (2013): Photo ionisation in mass spectrometry: light, selectivity and molecular ions. In *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (22), pp. 6901–6905. DOI: 10.1007/s00216-013-7187-4.

Zuber, Jan; Kroll, Marius M.; Rathsack, Philipp; Otto, Matthias (2016): Gas Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Pyrolysis Oil from German Brown Coal. In *International Journal of Analytical Chemistry* 2016 (3), pp. 1–12. DOI: 10.1155/2016/5960916.

7. Anhang

- Abbildungsverzeichnis
- Formelverzeichnis
- Tabellenverzeichnis
- Abkürzungsverzeichnis
- Liste der Publikationen
- Tabelle: Massendefekte der häufigsten Isotope

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Chromatographisches Dreieck.....	3
Abbildung 2 Chromatographisches Trennprinzip	6
Abbildung 3 Van-Deemter-Graph zur Bestimmung der Trennstufenhöhe mit Darstellung des Einflusses des Kapillarinneendurchmessers	7
Abbildung 4 Schema der chemischen Ionisierung	9
Abbildung 5 schematische Darstellung der APCI	10
Abbildung 6 bedeutendste Reaktionsmechanismen in der APCI.....	10
Abbildung 7 Schema Photoionisierung (Adaptierte Darstellung von (Dorfner et al. 2004))	11
Abbildung 8 Atmosphärendruck Ionisierungstechniken im Vergleich (angepasste Darstellung von Li et al. 2015)	12
Abbildung 9 schematische Darstellung eines Quadrupols adaptierte Darstellung von (Skoog et al. 2007)	14
Abbildung 10 Schema TOF-MS	15
Abbildung 11 Schema doppelfokussierendes Sektorfeld MS	16
Abbildung 12 schematische Darstellung der FT-ICR-Zelle mit Anregung der Ionen.....	17
Abbildung 13 Auswirkungen der Fourier-Transformation auf verschiedene Eingangssignale (Gross 2013)	18
Abbildung 14 Einfluss der Elementaren Zusammensetzung und des Toleranzintervalls auf die mögliche Anzahl der Summenformeln pro nominaler Masse	19
Abbildung 15 Schema der GC-APCI-FTICR MS Apparatur.....	23
Abbildung 16 Van-Deemter Funktion mit Termen (adaptierte Darstellung (APRENTAS 2017))	24
Abbildung 17 Van Deemter-Funktion für Helium.....	25
Abbildung 18 Histogramm zugewiesener Summenformeln einer Rohöl Probe bei Fließgeschwindigkeiten von 29 cm/s und 183 cm/s mit gemittelten Massenspektren in einem Bereich von m/z 500 - 700	26
Abbildung 19 Korrelation der detektierten m/z-Verhältnisses und der korrespondierenden Elutionszeiten einer Rohölprobe für verschiedene Trärgasgeschwindigkeiten	27
Abbildung 20 Auftrennung der normierten, extrahierten Ionenspuren von Phenanthren und Anthracen bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten und	

- unterschiedlichen Trägergasen (Helium und Stickstoff) und der korrespondierenden chromatographischen Auflösungen (R)..... 28
- Abbildung 21 Blasendiagramm des sauren Extrakts der verschiedenen Stufen des Heroin-Herstellungsprozesses basierend auf den Ergebnissen der GCxGC Analyse
a) Rohopium b) Morphin Base c) Heroin Base (braun) d) Heroin Base (weiß)
e) Heroin Hydrochlorid; [a–e] rot: Zielkomponenten des HAP, schwarz: Opiumalkaloide, orange: unveränderte Substanzen in allen Herstellungsstufen 32
- Abbildung 22 Aufgenommene Massenspektren von N-Acetylnornarcotin (links) und 3,6-Dimethoxy-4-acetoxy-5-(2-(N-methylacetamido))ethylphenanthren (rechts) mittels (EI)-TOFMS und APCI-FTICRMS..... 33
- Abbildung 23 Korrelation der Molekülmasse mit dem Retentionsindex von ausgewählten Substanzen der NIST08 Datenbank mit der elementaren Zusammensetzung CHNOS (ungefähr 65.000 Einträge von 12.000 Substanzen); a) m/z vs. Kováts Index (KI) mit farblich kodiertem DBE Wert; b) DBE modifizierter KI mit linearer Regression und Konfidenzintervall mit 500 Index Einheiten, verwendet um Fehlzuweisungen der Summenformeln zu identifizieren..... 35
- Abbildung 24 Chromatogramm eines Schweröls mit validiertem Bereich markiert 36
- Abbildung 25 Komponentenklassendiagramme der zugewiesene Summenformeln in ungealtertem und gealtertem Bitumen, mit Angabe des Verhältnisses ($[I_{\text{gealtert}} - I_{\text{ungealtert}}] / [I_{\text{ungealtert}} + I_{\text{gealtert}}]$) der normierten Intensitäten (auf Intensität der Standardsubstanz normiert); blaue Ellipsen markieren Bereiche in denen Summenformeln im ungealtertem Bitumen intensiver sind und die gelben Ellipsen markieren Bereiche in denen im gealtertem Bitumen Summenformeln intensiver sind..... 38
- Abbildung 26 Komponentenklassendiagramm der Spezies in Bitumen, die durch die künstliche Alterung reduziert wurden; b) Retentionsindex vs. Kohlenstoffanzahl Diagramm der reduzierten Komponenten mit farblich kodiertem Intensitätsverhältnis ($[I_{\text{gealtert}} - I_{\text{ungealtert}}] / [I_{\text{ungealtert}} + I_{\text{gealtert}}]$)..... 39
- Abbildung 27 Vergleich Massenauflösung zwischen HRTOF und HR-MS 42

Formelverzeichnis

Formel 1 Raoult'sches Gesetz.....	5
Formel 2 Van-Deemter-Gleichung.....	6
Formel 3 Massenauflösung	13
Formel 4 Berechnung des m/z-Verhältnisses für TOF-MS	14
Formel 5 Berechnung des m/z-Verhältnisses für FT-ICR Analysatoren	17
Formel 6 Berechnung der Elutionsdifferenz (<i>D</i>) in Sekunden bestimmter Komponenten einer Rohölprobe zwischen Fließgeschwindigkeiten von 29 cm/s und 183 cm/s	27
Formel 7 Chromatographische Auflösung	28
Formel 8 Berechnung des DBE modifizierten "vermutlichen Retentionsindex"	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 häufig eingesetzte Trägergase in der Gaschromatographie	4
Tabelle 2 Massendefekte der häufigsten Isotope	63

Abkürzungsverzeichnis

HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie (High Resolution Mass Spectrometry)
FT-ICR	Fouriertransformation Ionenzyklotronresonanz (Fourier transform ion cyclotron resonance)
TOF-MS	Flugzeit Massenspektrometer (Time-of-Flight)
HRTOF	Hochauflösendes Flugzeit Massenspektrometer
MS	Massenspektrometer
GC	Gaschromatograph
m/z	Masse-zu-Ladungs Verhältnis
ESI	Elektrospray-Ionisierung
APCI	chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
EI	Elektronenstoßionisierung (Electron Ionization)
CI	chemische Ionisierung
SPI	Ein Photon Ionisierung (single photon ionization)
REMPI	Resonanzverstärkte Mehrphotonenionisierung (resonance enhanced multi-photon ionization)
APPI	Photoionisierung unter Atmosphärendruck
APLI	Laserionisierung bei Atmosphärendruck
SCOT	„trägerbeschichteten“ Kapillarsäulen (support-coated open tubular column)
WCOT	Dünnschicht Kapillarsäulen (wall-coated open tubular column)
PLOT	Schichtkapillarsäule (porous layer open tubular column)
FSOT	Schichtkapillarsäule (fused-silica open tubular column)
HETP	theoretische Bodenhöhe (height equivalent to a theoretical plate)
R	Massenauflösung
FID	freier Induktionsabfall (free induction decay)
DBE	Ring- und Doppelbindungsequivalent
PTV	temperaturprogrammierbarer Injektor (programmed temperature vaporizer injector)
HAP	Deutsche Heroin Analysis Programm
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher

MCP	Mikrokanalplatten
GCxGC	2 dimensionale Gaschromatographie
FAME	Fettsäuremethylester
KI	Kováts Index
NIST	National Institute of Standards and Technology
FWHM	Peakbreite auf halber Peakhöhe (full width at half maximum)
Orbi	Thermo Orbitrap
WHO	World Health Organisation
BAK	Bundeskriminalamt

Tabelle 2 Massendefekte der häufigsten Isotope

OZ	Symbol	Element	Nominal- masse	Isotopenmasse	Isotop	Massendefekt
1	H	Wasserstoff	1	1,0078250322(6)	¹ H, Protium	0.007825
			2	2,0141017781(8)	² H, Deuterium	0.014101
2	He	Helium	3	3,01602932(2)	³ He	0.016029
			4	4,0026032541(4)	⁴ He	0.002603
3	Li	Lithium	6	6,015122887(9)	⁶ Li	0.015122
			7	7,016003 44(3)	⁷ Li	0.016003
4	Be	Beryllium	9	9,0121831(5)	⁹ Be	0.012183
5	B	Bor	10	10,012937(3)	¹⁰ B	0.01293
			11	11,009305(3)	¹¹ B	0.0093
6	C	Kohlenstoff	12	12 (exakt)	¹² C	
			13	13,003354835(2)	¹³ C	0.00335
7	N	Stickstoff	14	14,003074004(2)	¹⁴ N	0.00307
			15	15,000108899(4)	¹⁵ N	1E-04
8	O	Sauerstoff	16	15,994914620(2)	¹⁶ O	-0.00509
			17	16,999131757(5)	¹⁷ O	-0.00087
			18	17,999159613(6)	¹⁸ O	-0.00085
9	F	Fluor	19	18,998403163(6)	¹⁹ F	-0.0016
10	Ne	Neon	20	19,99244018(2)	²⁰ Ne	-0.00756
			21	20,9938467(3)	²¹ Ne	-0.00616
			22	21,9913851(2)	²² Ne	-0.00862
11	Na	Natrium	23	22,98976928(2)	²³ Na	-0.01024
12	Mg	Magnesium	24	23,98504170(9)	²⁴ Mg	-0.01496
			25	24,9858370(3)	²⁵ Mg	-0.01417
			26	25,9825930(2)	²⁶ Mg	-0.01741
13	Al	Aluminium	27	26,9815385(7)	²⁷ Al	-0.01847
14	Si	Silicium	28	27,976926535(3)	²⁸ Si	-0.02308
			29	28,976494665(3)	²⁹ Si	-0.02351
			30	29,97377001(2)	³⁰ Si	-0.02623
15	P	Phosphor	31	30,973761998(5)	³¹ P	-0.02624
16	S	Schwefel	32	31,972071174(9)	³² S	-0.02793
			33	32,971458910(9)	³³ S	-0.02855
			34	33,9678670(3)	³⁴ S	-0.03214
			36	35,967081(2)	³⁶ S	-0.03292
17	Cl	Chlor	35	34,9688527(3)	³⁵ Cl	-0.03115
			37	36,9659026(4)	³⁷ Cl	-0.0341
18	Ar	Argon	36	35,9675451(2)	³⁶ Ar	-0.03246
			38	37,962732(2)	³⁸ Ar	-0.03727
			40	39,96238312(2)	⁴⁰ Ar	-0.03762
19	K	Kalium	39	38,96370649(3)	³⁹ K	-0.0363
			40	39,9639982(4)	⁴⁰ K (radioaktiv)	-0.03601

			41	40,96182526(3)	⁴¹ K	-0.03818
20	Ca	Calcium	40	39,9625909(2)	⁴⁰ Ca	-0.03741
			42	41,958618(1)	⁴² Ca	-0.04139
			43	42,958766(2)	⁴³ Ca	-0.04124
			44	43,955482(2)	⁴⁴ Ca	-0.04452
			46	45,95369(2)	⁴⁶ Ca	-0.04631
			48	47,9525228(8)	⁴⁸ Ca (radioaktiv)	-0.04748
21	Sc	Scandium	45	44,955908(5)	⁴⁵ Sc	-0.0441
22	Ti	Titan	46	45,952628(3)	⁴⁶ Ti	-0.04738
			47	46,951759(3)	⁴⁷ Ti	-0.04825
			48	47,947942(3)	⁴⁸ Ti	-0.05206
			49	48,947866(3)	⁴⁹ Ti	-0.05214
			50	49,944787(3)	⁵⁰ Ti	-0.05522
23	V	Vanadium	50	49,947156(6)	⁵⁰ V (radioaktiv)	-0.05285
			51	50,943957(6)	⁵¹ V	-0.05605
24	Cr	Chrom	50	49,946042(6)	⁵⁰ Cr	-0.05396
			52	51,940506(4)	⁵² Cr	-0.0595
			53	52,940648(4)	⁵³ Cr	-0.05936
			54	53,938879(4)	⁵⁴ Cr	-0.06113
25	Mn	Mangan	55	54,938044(3)	⁵⁵ Mn	-0.06196
26	Fe	Eisen	54	53,939609(3)	⁵⁴ Fe	-0.0604
			56	55,934936(3)	⁵⁶ Fe	-0.06507
			57	56,935393(3)	⁵⁷ Fe	-0.06461
			58	57,933274(3)	⁵⁸ Fe	-0.06673
27	Co	Cobalt	59	58,933194(4)	⁵⁹ Co	-0.06681
28	Ni	Nickel	58	57,935342(3)	⁵⁸ Ni	-0.06466
			60	59,930786(3)	⁶⁰ Ni	-0.06922
			61	60,931056(3)	⁶¹ Ni	-0.06895
			62	61,928345(4)	⁶² Ni	-0.07166
			64	63,927967(4)	⁶⁴ Ni	-0.07204
29	Cu	Kupfer	63	62,929598(4)	⁶³ Cu	-0.07041
			65	64,927790(5)	⁶⁵ Cu	-0.07221
30	Zn	Zink	64	63,929142(5)	⁶⁴ Zn	-0.07086
			66	65,926034(6)	⁶⁶ Zn	-0.07397
			67	66,927128(6)	⁶⁷ Zn	-0.07288
			68	67,924845(6)	⁶⁸ Zn	-0.07516
			70	69,92532(2)	⁶⁹ Zn	-0.07468
31	Ga	Gallium	69	68,925574(8)	⁶⁹ Ga	-0.07443
			71	70,924703(6)	⁷¹ Ga	-0.0753
32	Ge	Germanium	70	69,924249(6)	⁷⁰ Ge	-0.07576
			72	71,9220758(5)	⁷² Ge	-0.07793
			73	72,9234590(4)	⁷³ Ge	-0.07655

			74	73,92117776(9)	⁷⁴ Ge	-0.07883
			76	75,9214027(2)	⁷⁶ Ge (radioaktiv)	-0.0786
33	As	Arsen	75	74,921595(6)	⁷⁵ As	-0.07841
34	Se	Selen	74	73,9224759(1)	⁷⁴ Se	-0.07753
			76	75,9192137(2)	⁷⁶ Se	-0.08079
			77	76,9199142(5)	⁷⁷ Se	-0.08009
			78	77,917309(2)	⁷⁸ Se	-0.0827
			80	79,916522(8)	⁸⁰ Se	-0.08348
			82	81,916700(9)	⁸² Se (radioaktiv)	-0.0833
35	Br	Brom	79	78,918338(9)	⁷⁹ Br	-0.08167
			81	80,91690(9)	⁸¹ Br	-0.0831
36	Kr	Krypton	78	77,920365(5)	⁷⁸ Kr (radioaktiv)	-0.07964
			80	79,916378(5)	⁸⁰ Kr	-0.08363
			82	81,913483(6)	⁸² Kr	-0.08652
			83	82,914127(2)	⁸³ Kr	-0.08588
			84	83,91149773(3)	⁸⁴ Kr	-0.08851
			86	85,91061063(3)	⁸⁶ Kr	-0.08939
37	Rb	Rubidium	85	84,91178974(3)	⁸⁵ Rb	-0.08822
			87	86,90918053(5)	⁸⁷ Rb (radioaktiv)	-0.09082
38	Sr	Strontium	84	83,913419(8)	⁸⁴ Sr	-0.08659
			86	85,909261(8)	⁸⁶ Sr	-0.09074
			87	86,908878(8)	⁸⁷ Sr	-0.09113
			88	87,905613(8)	⁸⁸ Sr	-0.09439
39	Y	Yttrium	89	88,90584(2)	⁸⁹ Y	-0.09416
40	Zr	Zirkonium	90	89,90470(2)	⁹⁰ Zr	-0.0953
			91	90,90564(2)	⁹¹ Zr	-0.09436
			92	91,90503(2)	⁹² Zr	-0.09497
			94	93,90631(2)	⁹⁴ Zr	-0.09369
			96	95,90827(2)	⁹⁶ Zr (radioaktiv)	-0.09173
41	Nb	Niob	93	92,90637(2)	⁹³ Nb	-0.09363
42	Mo	Molybdän	92	91,906808(5)	⁹² Mo	-0.0932
			94	93,905085(3)	⁹⁴ Mo	-0.09492
			95	94,905839(3)	⁹⁵ Mo	-0.09417
			96	95,904676(3)	⁹⁶ Mo	-0.09533
			97	96,906018(3)	⁹⁷ Mo	-0.09399
			98	97,905405(3)	⁹⁸ Mo	-0.0946
			100	99,907472(7)	¹⁰⁰ Mo (radioaktiv)	-0.09253
43	Tc	Technetium	98	97,90721(3)	⁹⁸ Tc (radioaktiv)	-0.09279

44	Ru	Ruthenium	96	95,907590(3)	⁹⁶ Ru	-0.09241
			98	97,90529(5)	⁹⁸ Ru	-0.09471
			99	98,905934(7)	⁹⁹ Ru	-0.09407
			100	99,904214(7)	¹⁰⁰ Ru	-0.09579
			101	100,905577(8)	¹⁰¹ Ru	-0.0945
			102	101,904344(8)	¹⁰² Ru	-0.0957
			104	103,90543(2)	¹⁰⁴ Ru	-0.0946
45	Rh	Rhodium	103	102,90550(2)	¹⁰³ Rh	-0.0945
46	Pd	Palladium	102	101,90560(2)	¹⁰² Pd	-0.0944
			104	103,904031(9)	¹⁰⁴ Pd	-0.096
			105	104,905080(8)	¹⁰⁵ Pd	-0.095
			106	105,903480(8)	¹⁰⁶ Pd	-0.0966
			108	107,903892(8)	¹⁰⁸ Pd	-0.0962
			110	109,905172(5)	¹¹⁰ Pd	-0.0949
47	Ag	Silber	107	106,90509(2)	¹⁰⁷ Ag	-0.095
			109	108,904755(9)	¹⁰⁹ Ag	-0.0953
48	Cd	Cadmium	106	105,906460(8)	¹⁰⁶ Cd	-0.0936
			108	107,904183(8)	¹⁰⁸ Cd	-0.0959
			110	109,903007(4)	¹¹⁰ Cd	-0.097
			111	110,904183(4)	¹¹¹ Cd	-0.0959
			112	111,902763(4)	¹¹² Cd	-0.0973
			113	112,904408(3)	¹¹³ Cd (radioaktiv)	-0.0956
			114	113,903365(3)	¹¹⁴ Cd	-0.0967
			116	115,904763(2)	¹¹⁶ Cd (radioaktiv)	-0.0953
49	In	Indium	113	112,904062(6)	¹¹³ In	-0.096
			115	114,90387878(8)	¹¹⁵ In (radioaktiv)	-0.0962
50	Sn	Zinn	112	111,904824(4)	¹¹² Sn	-0.0952
			114	113,902783(6)	¹¹⁴ Sn	-0.0973
			115	114,9033447(1)	¹¹⁵ Sn	-0.0967
			116	115,901743(1)	¹¹⁶ Sn	-0.0983
			117	116,902954(3)	¹¹⁷ Sn	-0.0971
			118	117,901607(3)	¹¹⁸ Sn	-0.0984
			119	118,903311(5)	¹¹⁹ Sn	-0.0967
			120	119,902202(6)	¹²⁰ Sn	-0.0978
			122	121,90344(2)	¹²² Sn	-0.0966
			124	123,905277(7)	¹²⁴ Sn	-0.0948
51	Sb	Antimon	121	120,90381(2)	¹²¹ Sb	-0.0962
			123	122,90421(2)	¹²³ Sb	-0.0958
52	Te	Tellur	120	119,90406(2)	¹²⁰ Te	-0.096
			122	121,90304(1)	¹²² Te	-0.097

			123	122,90427(1)	¹²³ Te	-0.0958
			124	123,90282(1)	¹²⁴ Te	-0.0972
			125	124,90443(1)	¹²⁵ Te	-0.0956
			126	125,90331(1)	¹²⁶ Te	-0.0967
			128	127,904461(6)	¹²⁸ Te (radioaktiv)	-0.0956
			130	129,90622275(8)	¹³⁰ Te (radioaktiv)	-0.0938
53	I	Iod	127	126,90447(3)	¹²⁷ I	-0.0956
54	Xe	Xenon	124	123,90589(2)	¹²⁴ Xe	-0.0942
			126	125,90430(3)	¹²⁶ Xe	-0.0957
			128	127,903531(7)	¹²⁸ Xe	-0.0965
			129	128,90478086(4)	¹²⁹ Xe	-0.0953
			130	129,9035094(1)	¹³⁰ Xe	-0.0965
			131	130,905084(2)	¹³¹ Xe	-0.095
			132	131,90415509(4)	¹³² Xe	-0.0959
			134	133,905395(6)	¹³⁴ Xe	-0.0947
			136	135,90721448(7)	¹³⁶ Xe (radioaktiv)	-0.0928
55	Cs	Caesium	133	132,90545196(6)	¹³³ Cs	-0.0946
56	Ba	Barium	130	129,90632(2)	¹³⁰ Ba (radioaktiv)	-0.0937
			132	131,905061(7)	¹³² Ba	-0.095
			134	133,904508(2)	¹³⁴ Ba	-0.0955
			135	134,905688(2)	¹³⁵ Ba	-0.0944
			136	135,904576(2)	¹³⁶ Ba	-0.0955
			137	136,905827(2)	¹³⁷ Ba	-0.0942
			138	137,905247(2)	¹³⁸ Ba	-0.0948
57	La	Lanthan	138	137,90712(3)	¹³⁸ La (radioaktiv)	-0.0929
			139	138,90636(2)	¹³⁹ La	-0.0937
58	Ce	Cer	136	135,907129(3)	¹³⁶ Ce	-0.0929
			138	137,90599(7)	¹³⁸ Ce	-0.0941
			140	139,90544(2)	¹⁴⁰ Ce	-0.0946
			142	141,90925(2)	¹⁴² Ce	-0.0908
59	Pr	Praseodym	141	140,90766(2)	¹⁴¹ Pr	-0.0924
60	Nd	Neodym	142	141,90773(2)	¹⁴² Nd	-0.0923
			143	142,90982(2)	¹⁴³ Nd	-0.0902
			144	143,91009(2)	¹⁴⁴ Nd (radioaktiv)	-0.09
			145	144,91258(2)	¹⁴⁵ Nd	-0.0875
			146	145,91312(2)	¹⁴⁶ Nd	-0.0869
			148	147,91690(2)	¹⁴⁸ Nd	-0.0831

			150	149,92090(2)	¹⁵⁰ Nd (radioaktiv)	-0.0791
61	Pm	Promethium	145	144,91276(2)	¹⁴⁵ Pm (radioaktiv)	-0.0873
62	Sm	Samarium	144	143,91201(2)	¹⁴⁴ Sm	-0.088
			147	146,91490(2)	¹⁴⁷ Sm (radioaktiv)	-0.0851
			148	147,91483(2)	¹⁴⁸ Sm (radioaktiv)	-0.0852
			149	148,91719(2)	¹⁴⁹ Sm	-0.0829
			150	149,91728(2)	¹⁵⁰ Sm	-0.0828
			152	151,91974(2)	¹⁵² Sm	-0.0803
			154	153,92222(2)	¹⁵⁴ Sm	-0.0778
63	Eu	Europium	151	150,91986(2)	¹⁵¹ Eu (radioaktiv)	-0.0802
			153	152,92124(2)	¹⁵³ Eu	-0.0788
64	Gd	Gadolinium	152	151,91980(2)	¹⁵² Gd	-0.0802
			154	153,92087(2)	¹⁵⁴ Gd	-0.0792
			155	154,92263(2)	¹⁵⁵ Gd	-0.0774
			156	155,92213(2)	¹⁵⁶ Gd	-0.0779
			157	156,92397(2)	¹⁵⁷ Gd	-0.0761
			158	157,92411(2)	¹⁵⁸ Gd	-0.0759
			160	159,92706(2)	¹⁶⁰ Gd	-0.073
65	Tb	Terbium	159	158,92535(2)	¹⁵⁹ Tb	-0.0747
66	Dy	Dysprosium	156	155,92428(2)	¹⁵⁶ Dy	-0.0758
			158	157,92442(2)	¹⁵⁸ Dy	-0.0756
			160	159,92520(2)	¹⁶⁰ Dy	-0.0748
			161	160,92694(2)	¹⁶¹ Dy	-0.0731
			162	161,92681(2)	¹⁶² Dy	-0.0732
			163	162,92874(2)	¹⁶³ Dy	-0.0713
			164	163,92918(2)	¹⁶⁴ Dy	-0.0709
67	Ho	Holmium	165	164,93033(2)	¹⁶⁵ Ho	-0.0697
68	Er	Erbium	162	161,92879(2)	¹⁶² Er	-0.0713
			164	163,92921(2)	¹⁶⁴ Er	-0.0708
			166	165,93030(2)	¹⁶⁶ Er	-0.0697
			167	166,93205(2)	¹⁶⁷ Er	-0.068
			168	167,93238(2)	¹⁶⁸ Er	-0.0677
			170	169,93547(2)	¹⁷⁰ Er	-0.0646
69	Tm	Thulium	169	168,93422(2)	¹⁶⁹ Tm	-0.0658
70	Yb	Ytterbium	168	167,93389(2)	¹⁶⁸ Yb	-0.0662
			170	169,93477(2)	¹⁷⁰ Yb	-0.0653
			171	170,93633(2)	¹⁷¹ Yb	-0.0637
			172	171,93639(2)	¹⁷² Yb	-0.0637
			173	172,93822(2)	¹⁷³ Yb	-0.0618

			174	173,93887(2)	¹⁷⁴ Yb	-0.0612
			176	175,94258(2)	¹⁷⁶ Yb	-0.0575
71	Lu	Lutetium	175	174,94078(2)	¹⁷⁵ Lu	-0.0593
			176	175,94269(2)	¹⁷⁶ Lu (radioaktiv)	-0.0574
72	Hf	Hafnium	174	173,94005(2)	¹⁷⁴ Hf (radioaktiv)	-0.06
			176	175,94141(2)	¹⁷⁶ Hf	-0.0586
			177	176,94323(2)	¹⁷⁷ Hf	-0.0568
			178	177,94371(2)	¹⁷⁸ Hf	-0.0563
			179	178,94582(2)	¹⁷⁹ Hf	-0.0542
			180	179,94656(2)	¹⁸⁰ Hf	-0.0535
73	Ta	Tantal	180	179,94746(2)	¹⁸⁰ Ta (radioaktiv)	-0.0526
			181	180,94800(2)	¹⁸¹ Ta	-0.052
74	W	Wolfram	180	179,94671(2)	¹⁸⁰ W (radioaktiv)	-0.0533
			182	181,948204(6)	¹⁸² W	-0.0518
			183	182,950223(6)	¹⁸³ W	-0.0498
			184	183,950931(6)	¹⁸⁴ W	-0.0491
			186	185,95436(2)	¹⁸⁶ W	-0.0457
75	Re	Rhenium	185	184,952955(8)	¹⁸⁵ Re	-0.0471
			187	186,95575(1)	¹⁸⁷ Re (radioaktiv)	-0.0443
76	Os	Osmium	184	183,952489(9)	¹⁸⁴ Os (radioaktiv)	-0.0476
			186	185,95384(1)	¹⁸⁶ Os (radioaktiv)	-0.0462
			187	186,95575(1)	¹⁸⁷ Os	-0.0443
			188	187,95584(1)	¹⁸⁸ Os	-0.0442
			189	188,95814(2)	¹⁸⁹ Os	-0.0419
			190	189,95844(2)	¹⁹⁰ Os	-0.0416
			192	191,96148(2)	¹⁹² Os	-0.0386
77	Ir	Iridium	191	190,96059(2)	¹⁹¹ Ir	-0.0395
			193	192,96292(2)	¹⁹³ Ir	-0.0371
78	Pt	Platin	190	189,95993(4)	¹⁹⁰ Pt (radioaktiv)	-0.0401
			192	191,96104(2)	¹⁹² Pt	-0.039
			194	193,962681(6)	¹⁹⁴ Pt	-0.0374
			195	194,964792(6)	¹⁹⁵ Pt	-0.0353
			196	195,964952(6)	¹⁹⁶ Pt	-0.0351
			198	197,96789(2)	¹⁹⁸ Pt	-0.0322
79	Au	Gold	197	196,966569(5)	¹⁹⁷ Au	-0.0335
80	Hg	Quecksilber	196	195,96583(2)	¹⁹⁶ Hg	-0.0342

			198	197,966769(3)	¹⁹⁸ Hg	-0.0333
			199	198,968281(3)	¹⁹⁹ Hg	-0.0318
			200	199,968327(3)	²⁰⁰ Hg	-0.0317
			201	200,970303(5)	²⁰¹ Hg	-0.0297
			202	201,970643(5)	²⁰² Hg	-0.0294
			204	203,973494(3)	²⁰⁴ Hg	-0.0266
81	Tl	Thallium	203	202,972345(9)	²⁰³ Tl	-0.0277
			205	204,974428(9)	²⁰⁵ Tl	-0.0256
82	Pb	Blei	204	203,973044(8)	²⁰⁴ Pb	-0.027
			206	205,974466(8)	²⁰⁶ Pb	-0.0256
			207	206,975897(8)	²⁰⁷ Pb	-0.0242
			208	207,976653(8)	²⁰⁸ Pb	-0.0234
83	Bi	Bismut	209	208,98040(1)	²⁰⁹ Bi (radioaktiv)	-0.0196
90	Th	Thorium	230	230,03313(2)	²³⁰ Th (radioaktiv)	0.0331
			232	232,03806(2)	²³² Th (radioaktiv)	0.038
91	Pa	Protactinium	231	231,03588(2)	²³¹ Pa (radioaktiv)	0.0358
92	U	Uran	233	233,03964(2)	²³³ U (radioaktiv)	0.0396
			234	234,04095(2)	²³⁴ U (radioaktiv)	0.0409
			235	235,04393(2)	²³⁵ U (radioaktiv)	0.0439
			238	238,05079(2)	²³⁸ U (radioaktiv)	0.0507

8. Veröffentlichungen

Gas Chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization FT-ICR mass spectrometry for improvement of data reliability

von

Theo Schwemer, Christopher P. Rüger, Martin Sklorz, Ralf Zimmermann

Analytical Chemistry

2015, 87 (24), 11957-11961

DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02114

Gas Chromatography Coupled to Atmospheric Pressure Chemical Ionization FT-ICR Mass Spectrometry for Improvement of Data Reliability

Theo Schwemer,^{†,‡} Christopher P. Rüger,[†] Martin Sklorz,^{*,†,§} and Ralf Zimmermann^{†,‡,§}

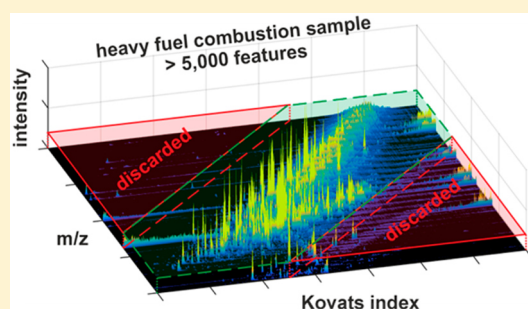
[†]Joint Mass Spectrometry Centre/Chair of Analytical Chemistry, University of Rostock, 18051 Rostock, Germany

[‡]HICE – Helmholtz Virtual Institute of Complex Molecular Systems in Environmental Health – Aerosols and Health, 85764 Neuherberg, Germany, www.hice-vi.eu

[§]Joint Mass Spectrometry Centre/Cooperation Group Comprehensive Molecular Analytics, Helmholtz Zentrum München, 85764 Neuherberg, Germany

S Supporting Information

ABSTRACT: Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) offers the advantage of molecular ion information with low fragmentation. Hyphenating APCI to gas chromatography (GC) and ultrahigh resolution mass spectrometry (FT-ICR MS) enables an improved characterization of complex mixtures. Data amounts acquired by this system are very huge, and existing peak picking algorithms are usually extremely time-consuming, if both gas chromatographic and ultrahigh resolution mass spectrometric data are concerned. Therefore, automatic routines are developed that are capable of handling these data sets and further allow the identification and removal of known ionization artifacts (e.g., water- and oxygen-adducts, demethylation, dehydrogenation, and decarboxylation). Furthermore, the data quality is enhanced by the prediction of an estimated retention index, which is calculated simply from exact mass data combined with a double bond equivalent correction. This retention index is used to identify mismatched elemental compositions. The approach was successfully tested for analysis of semivolatile components in heavy fuel oil and diesel fuel as well as primary combustion particles emitted by a ship diesel research engine. As a result, 10–28% of the detected compounds, mainly low abundant species, classically assigned by using only the mass spectrometric information, were identified as not valid and removed. Although GC separation is limited by the slow acquisition rate of the FT-ICR MS (<1 Hz), a database driven retention time comparison, as commonly used for low resolution GC/MS, can be applied for revealing isomeric information.



Complex analytical matrices requires improved sensitivity and resolution of instruments to provide a more accurate and comprehensive characterization of investigated samples. Ultrahigh resolution mass spectrometry (HR-MS) can feasibly be used to separate and assign elemental compositions to more than 17 000 species in a complex sample¹ within a few minutes. But without pre separation or application of MSⁿ, it is possible neither to distinguish between analytes and fragments nor to differentiate isomeric species without further fragmentation. Ion sources applied for HR-MS such as electrospray ionization (ESI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI), or atmospheric pressure photo ionization (APPI) mainly form molecular ions, which facilitate the mass spectra and data interpretation. Unfortunately, these techniques are not devoid of ionization artifacts^{2,3} and competition,⁴ leading to false assignments and reduced reliability.

Since the first successful coupling of gas chromatography (GC) to a FT-ICR MS,⁵ no significant advantages over the conventional GC/MS systems with electron ionization (EI) have been demonstrated. The hyphenation of GC and APCI to

Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS), which was first introduced by Barrow et al. in 2014,⁶ could change this situation for certain application areas. In contrast to the common GC/MS systems, this technique provides ultrahigh resolved mass spectrometric information for molecular ions, but a huge amount of data is acquired (several tens of gigabytes) and data analysis is extremely time-consuming. As a consequence, Barrow et al. reduced the data by averaging mass spectra for a 2 min time interval. This facilitates the data analysis but does not exploit the whole of the chromatographic information. Generally, the assignment of elemental composition to exact masses is restricted by instrumental mass accuracy and resolution.^{7,8} Even the application of data analysis and reduction routines^{9–11} for filtering chemically correct elemental compositions is not always sufficient to provide unique assignments. The accuracy

Received: June 4, 2015

Accepted: November 11, 2015

Published: November 11, 2015



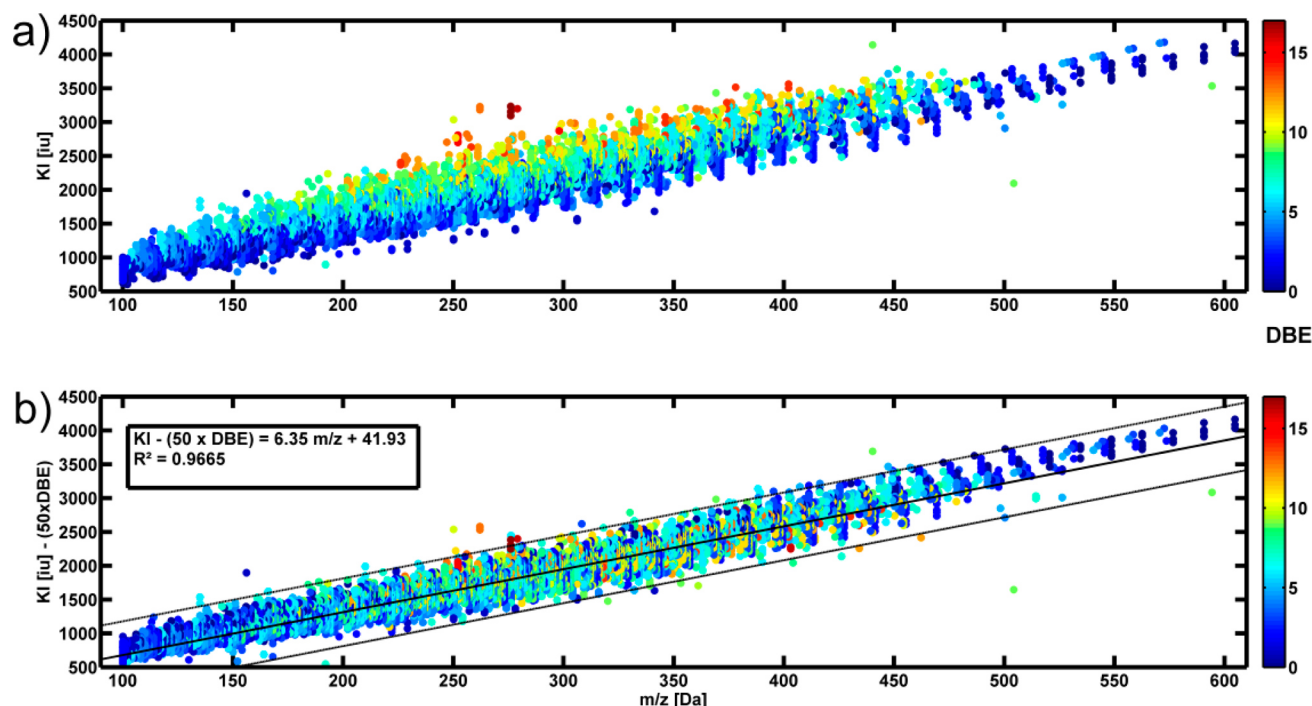


Figure 1. Correlation of molecular mass to the retention index of selected substances of NIST08 database with an elemental composition of CHNOS (approximately 65 000 entries, representing 12 000 compounds): (a) m/z vs Kovats index with color coded double bond equivalents; (b) DBE modified KI with linear fit and the deviation interval of 500 index units, applied for filtering misassignments.

of formula assignment can be enhanced by use of both, exact mass and retention time information.

Comprehensive retention time databases, offered for example by the National Institute of Standards and Technology (NIST) or Wiley, can be used to evaluate assigned elemental compositions. More than 290 000 retention indices are listed in the NIST08 database for different GC parameters. Nevertheless, only listed compounds can be checked: e.g., for a 5% phenylsilicone equivalent column, about 12 000 CHNOS compounds corresponding to 2500 elemental compositions are given in NIST08, which is far below the estimated complexity of, e.g., crude oil or other complex samples.

Therefore, we applied a more general approach to exclude falsely assigned elemental compositions by applying a regression of the detected mass-to-charge ratios (m/z) to their corresponding retention indices. Further improvement is achieved by including the π – π -interactions of molecules with the stationary phase, estimated by determining double bond equivalents (DBE). This allows the calculation of a general function for evaluation of detected retention indices, which is applicable independently of a database, but not for chemical entities.

The aim of this study was the improvement of the GC APCI FT-ICR MS data analysis by development and application of automatic routines combining gas chromatographic and ultrahigh resolution mass spectrometric information. Thereby, retention index information is used for the first time to evaluate elemental compositions. As an application of this approach, semivolatile components in heavy fuel oil and diesel fuel as well as primary combustion particles from a diesel research engine were investigated.

EXPERIMENTAL SECTION

Particulate matter from diesel fuel and heavy fuel oil combustion was collected. A four-stroke diesel engine at the Chair of Piston Machines and Internal Combustion Engines at the University of Rostock was used for the combustion experiments. Detailed information on the engine and load cycles are given in Sippula et al.,¹⁵ and information about sample acquisition and preparation are summarized in Supporting Information Table S-1.

Instrumental parameters are listed in the Supporting Information Tables S2 and S3, respectively. In brief, a 5%-phenylmethylsilicone HT-column with 25 m length, 0.53 mm i.d., and 0.15 μ m film thickness was used for separation. The high linear carrier gas velocity (He) of about 10 mL/min, which is far beyond the Van Deemter optimum, and the high temperature ramp of 10 $^{\circ}$ C/min enabled the separation of even high boiling and thermo labile compounds at moderate oven temperatures. Thereby the complete chromatographic separation was realized after 40 min. Peak widths of about 10 s (corresponding to approximately 15 index units) even for very high boiling compounds such as coronene ($T_{\text{boil}} = 525$ $^{\circ}$ C) were obtained. The Bruker 7 T FT-ICR MS was equipped with a gas phase APCI interface¹⁶ and tuned to a resolution of 200 000 for $m/z = 300$ at a scan speed of approximately 0.6 Hz. Retention indices of sample compounds were externally calibrated with a standard mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons.

Mass spectra were internally calibrated and exported to MATLAB for further data processing based on a modified approach of Tautenhahn et al.¹⁷ Main important differences to the original are the addition of two features using the GC-retention time.

Filtering Known Ionization Adducts and Fragments. In order to identify and filter ionization artifacts, a correlation

Table 1. Applied Data Analysis Filter Steps for Different Fuels and Combustion Particles

filter steps	diesel fuel	particulate matter of diesel fuel	heavy fuel oil	particulate matter of heavy fuel oil
detected signals	1249	1229	2776	2292
compounds removed by applying routine filters ^a	642	492	1064	721
compounds identified as known adducts and fragments	15	13	51	25
compounds removed by retention time window correlation	172	341	281	369
remaining compounds (number of different sum formulas)	420 (262)	383 (245)	1380 (1003)	1177 (834)

^aRoutine filters consist of blank correction (approximately 3%), removal of not assignable CHNOS sum formulas (approximately 48%), removal of isotopic signals (approximately 24%), and removal of assigned elemental composition, which does not fulfill the nitrogen rule or have a higher DBE value than carbon number + 1, which is chemically impossible (approximately 28%).

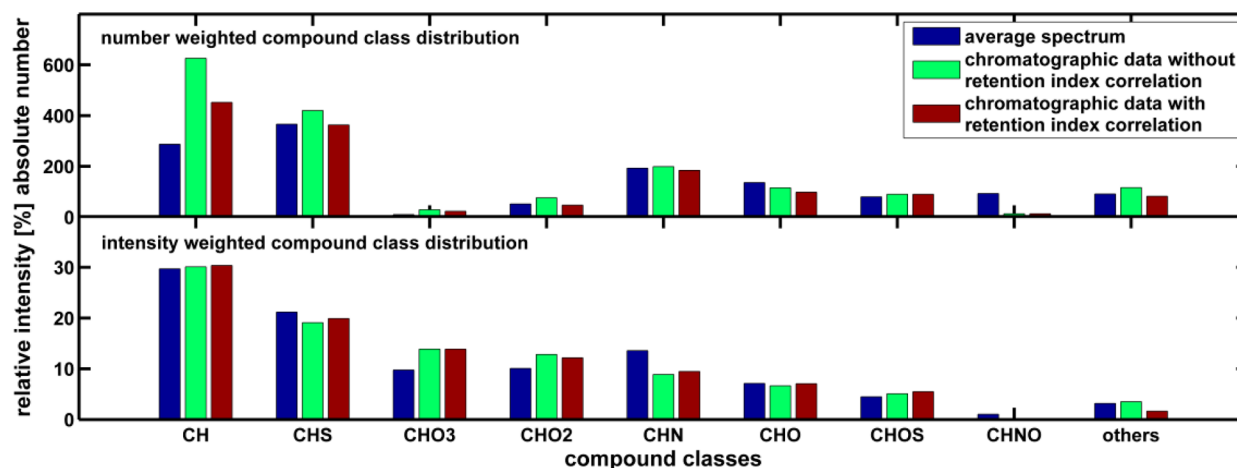


Figure 2. Comparison of most abundant compound classes in heavy fuel oil assigned by average spectrum data (blue), chromatographic separation without applying the KI correlation (green), and chromatographic separated data with application of the KI correlation (red) based on the absolute number of compounds (top) and on the relative intensity of compounds (bottom).

of the compounds with paired ion traces and defined exact mass difference was implemented. The intensity of formed radical cations $[M]^{+\bullet}$, which are known for APCI,¹⁸ were combined with the protonated molecules $[M + H]^+$, if both were present. The existence of additional ionization adducts and fragments known from the literature^{2,3,19} and our own prestudies were proved by an investigation of coeluting ion traces with defined mass differences²⁰ (2.0157 Da for hydrogen, 15.0235 Da for methyl group, 15.9949 Da for oxygen, 18.0106 Da for water, and 43.9893 Da for carbon dioxide), in an interval of 1 ppm of molecular mass. Paired ion traces with a calculated Pearson-correlation coefficient ≥ 0.8 in a confidence interval of 95% were identified. If the estimated ionization artifact $[M \pm \text{adduct} + H]^+$ had a lower intensity than the paired protonated ion trace, the selected compound was discarded. For the remaining compounds, elemental compositions were assigned and checked using the retention time information. Elemental compositions were restricted to the following formula: $C_cH_hN_nO_oS_s$, $c \leq 100$, $h \leq 160$, $n \leq 3$, $o \leq 10$, $s \leq 3$ and a maximum mass error of 2 ppm. Furthermore, intensity ratios of the ^{13}C -isotopes were used for validation of the carbon atom number, and the calculated DBE-value was restricted to $\text{DBE} \leq \text{carbon atoms} + 1$.

Data Evaluation by Retention Index Correlation. By use of reference compounds for assignment of a retention index, for example Kováts Index (KI),²¹ the gas chromatographic analysis becomes more independent of retention-influencing parameters and conditions.²² Nevertheless, unknown substances still cannot be identified only by matching their retention indices. Through extraction of all compounds with exact mass, elemental composition, and retention index

from the NIST08 retention library, a correlation between molecular mass and retention index was revealed. The elemental composition was restricted to elements (CHNOS), known to be present in the organic part of crude oil^{12,13} and combustion aerosol,¹⁴ and only mass-to-charge ratios above 100 are considered. By doing this, the NIST data set was reduced to approximately 65 000 entries. The data analysis of this correlation pointed out that substances with the same nominal mass show higher retention indices for a higher degree of unsaturation, which can be attributed to stronger interactions with the stationary phase (π - π -bond interactions with the 5% phenyl-groups inside the used stationary phase; Figure 1a).

Modification of the KI with the calculated DBE values narrows the distribution and enabled the calculation of a linear fit, which can be described by eq 1. To evaluate detected compounds, for every assigned elemental composition, a KI modified by DBE is calculated and matched to the interval given by eq 1 and a deviation of ± 500 IU, which contained more than 99.9% of used data points in the NIST08 retention database.

$$\text{KI} = 6.35m/z + 41.93 + (50 \times \text{DBE}) \quad (1)$$

Elemental compositions that do not match are discarded, and compounds with no valid elemental composition are eliminated completely from the list of compounds.

RESULTS AND DISCUSSION

Data analysis routines were applied to heavy fuel oil and diesel fuel as well as to their corresponding combustion particles. Table 1 shows the results of the applied filter steps while data processing.

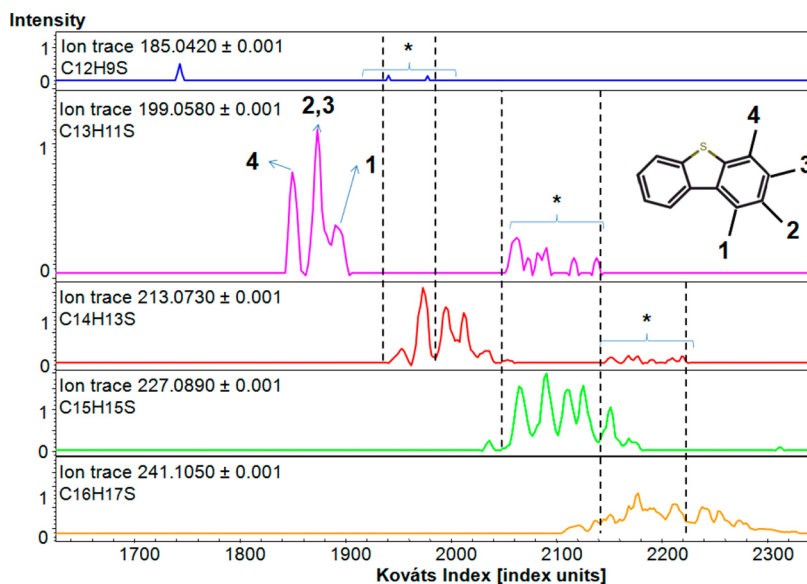


Figure 3. GC APCI FT-ICR MS protonated ion chromatograms of m/z 185.042 ($C_{12}H_9S$, dibenzothiophene), 199.058 ($C_{13}H_{11}S$, four possible structural isomers of methylated dibenzothiophenes), 213.073 ($C_{14}H_{13}S$, 32 possible alkylated isomers), 227.089 ($C_{15}H_{15}S$ – 396 possible alkylated isomers) and 241.105 ($C_{16}H_{17}S$, 2104 possible alkylated isomers) with exemplary compound evaluation of the methyl-dibenzothiophenes via Kováts index in a heavy fuel oil sample; within the extracted ion chromatogram of 199.058 position of the methyl group is given by retention index matching; the * marks identified C_2H_4 -dealkylation products from higher alkylated dibenzothiophenes.

The routine for fragment and adduct identification removed approximately 1–2% of the detected compounds. This included ionization artifacts observed by the formation of water^{2,3} and oxygen adducts as well as demethylation, dehydrogenation,² and decarboxylation.² Further, 10–28% of detected signals are removed by applying the retention time algorithm for evaluation of KIs of assigned elemental compositions. In total, for diesel fuel and corresponding combustion particles, about one-third of all detected compounds were validated, while for heavy fuel oil and its particulate matter, it was about half of the compounds.

To get a more detailed view of the compound classes that were affected the most by the exclusion, three different modes were compared with each other. Figure 2 shows compound class distribution of an averaged spectrum without using any chromatographic information (blue) and chromatographic data with (red) and without (green) retention index filtering of compounds. It turned out that the high number of isomers (difference between green and blue bars), especially for the compound classes CH and CHS, had a clear effect on the number weighted compound class distribution. The investigation of chromatographic data with and without filtering showed a significant reduction in the number of evaluated chromatographic data points filtered by correlation of retention index. The differences are mainly caused by the exclusion of false assignments (75–95%), most probably fragments with retention times outside the given KI correlation, which contributed to the CH class as well as CHS and CHO_x classes. Furthermore, the absolute number and the relative intensity of compounds not belonging to the main classes, summarized as “others,” were reduced by applying the KI filter. Regarding the intensity weighted compound class distribution, the effects of filtering by application of chromatographic information were less unambiguous, as the intensities of the excluded assignments were relatively low.

Gas Chromatographic Separation. It is not possible to achieve baseline separation of all isomeric compounds by one-

dimensional chromatography, as the complexity of detectable compounds within fuel and particulate matter is very large.^{24,25} Nonetheless, even with reduced separation power, homologous series can easily be verified by a difference of about 100 IU caused by the addition of one CH_2 group. Validated compounds of such series can be used to verify other compounds of the same series via discrete retention index distances and so on. For baseline separated species also, concrete isomeric structures can be proposed using literature retention index and the acquired mass. Figure 3 shows exemplarily the order of retention for the methyl-dibenzothiophenes with a KI range between 1850 and 1900 IU, in accordance with literature values of Mössner et al.²³ Furthermore, compounds in a wide range of boiling points (218 °C, naphthalene to 525 °C, coronene) and different compound classes, e.g., alkenes, thiophenes, benzothiophenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, acridines, and benzofurans, were detected.

Additionally, the chromatographic information enabled the identification of ionization artifacts, which are not known a priori: e.g., signals, which appear at the same retention time, but at m/z traces of other alkyl-dibenzothiophenes. These signals are clearly visible in the first three extracted ion chromatograms (EIC) of Figure 3. Isomeric species may be suspected, but for the ion trace 185.042 ($C_{12}H_9S$), no substance with a KI difference of about 200 IU higher is registered in NIST, neither in the NIST08 database, nor in the NIST Chemistry WebBook.²⁶ In addition, the retention index of dibenzothiophene was validated with 1755 IU by an external standard. Other ion traces showed similar signals, and data analysis revealed that these could be correlated to species plus a C_2H_4 -building block. A reason for these signals could be the dealkylation of higher alkylated dibenzothiophenes during ionization. The circumstance that the chromatographic ion trace of the $[M+C_2H_4]$ species did not fit completely with the appearing artifacts species (Figure 3) at the analyte $[M]$ ion

trace is due to the fact that ethyl species seemed to split off more often.

Other polycyclic aromatic compounds, e.g., phenanthrene or pyrene, show similar artifacts. Until now, the mechanism is not completely understood, but atmospheric pressure chemical ionization is rather complex, and several adducts and fragments could be formed. Similar ions are also observed with electron ionization, known as onium reaction products, but in this case higher ionization energy is applied. Nevertheless, the C_2H_4 loss is only one example, which is to our best knowledge not reported so far in the literature for APCI. The better understanding of the ionization processes and reaction products is therefore the key for the evaluation of acquired data and an improved characterization of the sample.

CONCLUSION

The here presented study shows for the first time the improvement of ultrahigh resolution mass spectrometric data by use of retention index information in a GC APCI FT-ICR MS approach. Utilizing chromatographic retention information and automatic data processing routines reduces the number of false assignments and ionization artifacts such as adducts and fragments. Furthermore, the accuracy of assigned elemental compositions is enhanced, which improves data reliability. Obviously, the measurement and data analysis of chromatographic data is more time-consuming compared to a direct infusion approach. The used algorithm was optimized for the analysis of petroleum samples and their combustion products. The authors believe that the developed data analysis is also applicable for other analytical fields, where gas chromatography/mass spectrometry is the method of choice. But especially the retention index matching will need further adjustment, if a more polar column is used for separation or the component class is extended to compounds beyond CHNOS. Nevertheless, GC APCI FT-ICR MS has the potential to be used for retention time based analyses of selected components with given elemental compositions and their isomeric structures.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02114.

Tables S1–S5 and Figures S1–S4 (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: martin.sklorz@uni-rostock.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Funding by the Helmholtz Foundation for the HICE virtual institute (www.hice-vi.eu) and the state scholarship program, which are funded by the European Social Funds (ESF), is gratefully acknowledged. Furthermore, we thank the DFG for funding of the Bruker FT-ICR MS.

REFERENCES

(1) Marshall, A. G.; Rodgers, R. P. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 53–59.

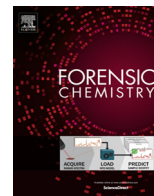
- (2) Amundson, L. M.; Gallardo, V. A.; Vinuesa, N. R.; Owen, B. C.; Reece, J. N.; Habicht, S. C.; Fu, M.; Shea, R. C.; Mossman, A. B.; Kenttämää, H. I. *Energy Fuels* **2012**, *26*, 2975–2989.
- (3) David, F.; Dunkle, M.; Tienpont, B.; Mitsui, K.; Ochiai, N.; Sasamoto, K.; Higashi, N.; Sandra, P. *LC GC Europe* **2013**, *26*, 548–556.
- (4) Ghislain, T.; Faure, P.; Michels, R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 530–536.
- (5) Ledford, E. B. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2450–2451.
- (6) Barrow, M. P.; Peru, K. M.; Headley, J. V. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 8281–8288.
- (7) Kim, S.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *251*, 260–265.
- (8) Marshall, A. G.; Rodgers, R. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 18090–18095.
- (9) Kind, T.; Fiehn, O. *BMC Bioinf.* **2007**, *8*, 105.
- (10) Koch, B. P.; Dittmar, T.; Witt, M.; Kattner, G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1758.
- (11) Kind, T.; Fiehn, O. *Bioanalytical Reviews* **2010**, *2*, 23–60.
- (12) Hughey, C. A.; Hendrickson, C. L.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.; Qian, K. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4676–4681.
- (13) Stanford, L. A.; Kim, S.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G. *Energy Fuels* **2006**, *20*, 1664–1673.
- (14) Aiken, A. C.; Salcedo, D.; Cubison, M. J.; Huffman, J. A.; DeCarlo, P. F.; Ulbrich, I. M.; Docherty, K. S.; Sueper, D.; Kimmel, J. R.; Worsnop, D. R.; Trimborn, A.; Northway, M.; Stone, E. A.; Schauer, J. J.; Volkamer, R. M.; Fortner, E.; De Foy, B.; Wang, J.; Laskin, A.; Shutthanandan, V.; Zheng, J.; Zhang, R.; Gaffney, J.; Marley, N. A.; Paredes-Miranda, G.; Arnott, W. P.; Molina, L. T.; Sosa, G.; Jimenez, J. L. *Atmos. Chem. Phys.* **2009**, *9*, 6633–6653.
- (15) Sippula, O.; Stengel, B.; Sklorz, M.; Streibel, T.; Rabe, R.; Orasche, J.; Lintelmann, J.; Zimmermann, R. *Environmental Science Technology* **2014**, *32*.
- (16) Schiewek, R.; Lorenz, M.; Giese, R.; Brockmann, K.; Benter, T.; Gäb, S.; Schmitz, O. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 87.
- (17) Tautenhahn, R.; Bottcher, C.; Neumann, S. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*.
- (18) Horning, E. C.; Horning, M. G.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Stillwel, Rn. *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 936–943.
- (19) Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Barceló, D. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5441–5449.
- (20) Tautenhahn, R.; Bottcher, C.; Neumann, S. *Bioinformatics Research and Development. First International Conference, BIRD 2007. Proceedings (Lecture Notes in Bioinformatics Vol. 4414)* **2007**, *4414*, 371–380.
- (21) Kováts, E. *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 1915–1932.
- (22) Castello, G. *Journal of Chromatography A* **1999**, *842*, 51–64.
- (23) Mössner, S. G.; Lopez De Alda, M. J.; Sander, L. C.; Lee, M. L.; Wise, S. A. *Journal of Chromatography A* **1999**, *841*, 207–228.
- (24) Kotianova, P.; Matisova, E.; Puxbaum, H.; Lehotay, J. *Chemia Analytica* **2004**, *49*, 833–844.
- (25) Hallquist, M.; Wenger, J. C.; Baltensperger, U.; Rudich, Y.; Simpson, D.; Claeys, M.; Dommen, J.; Donahue, N. M.; George, C.; Goldstein, A. H.; Hamilton, J. F.; Herrmann, H.; Hoffmann, T.; Iinuma, Y.; Jang, M.; Jenkin, M. E.; Jimenez, J. L.; Kiendler-Scharr, A.; Maenhaut, W.; McFiggans, G.; Mentel, T. F.; Monod, A.; Prevot, A. S. H.; Seinfeld, J. H.; Surratt, J. D.; Szmigielski, R.; Wildt, J. *Atmos. Chem. Phys.* **2009**, *9*, 5155–5236.
- (26) In NIST Standard Reference database 69, February 2015 release; National Institute of Standards and Technology (NIST), Washington, DC.

**Characterization of a heroin manufacturing process based
on acidic extracts by combining complementary
information from two-dimensional gas chromatography
and high resolution mass spectrometry**

von

Theo Schwemer, Thorsten Rössler, Björn Ahrens, Marion Schäffer, Alexandra Hasselbach-Minor, Michael
Pütz, Martin Sklorz, Thomas Gröger, Ralf Zimmermann

Forensic Chemistry
4, 2017, 9-18
DOI: 10.1016/j.forc.2017.02.006



Characterization of a heroin manufacturing process based on acidic extracts by combining complementary information from two-dimensional gas chromatography and high resolution mass spectrometry



Theo Schwemer^a, Thorsten Rössler^c, Björn Ahrens^c, Marion Schäffer^{a,b}, Alexandra Hasselbach-Minor^c, Michael Pütz^c, Martin Sklorz^a, Thomas Gröger^b, Ralf Zimmermann^{a,b}

^aJoint Mass Spectrometry Center, Chair of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, University of Rostock, Dr.-Lorenz-Weg 1, 18059 Rostock, Germany

^bJoint Mass Spectrometry Center, Comprehensive Molecular Analytics, Helmholtz Zentrum München, Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Oberschleißheim, Germany

^cBundeskriminalamt – Federal Criminal Police Office, Forensic Science Institute, KT 45 – Toxicology, 65173 Wiesbaden, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2016

Accepted 16 February 2017

Available online 20 February 2017

Keywords:

Heroin

Impurities

Profiling

GC×GC

GC-HRTOFMS

GC-APCI-FTICRMS

ABSTRACT

A comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometric approach (GC×GC-TOFMS) supported by one-dimensional gas chromatography high resolution mass spectrometers (GC-HRTOFMS, GC-FTICRMS) were used to track and confirm characteristic chemical impurities through an authentic illicit heroin production process. Minor and trace compounds present in illicit heroin that result from the used opium and the manufacturing process generate a specific impurity profile of each batch. Based on that, comparative analysis of heroin samples is possible, which can contribute amongst others to the uncovering of links between seized samples. The illicit manufacturing processes are thereby only vaguely described in the literature. Neutral and acidic compounds of the unadulterated impurity profiles at different stages during an authentic manufacturing process of heroin were analyzed by comprehensive two-dimensional gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOFMS). The focus was set on 44 compounds, mostly acetylation products, found in the heroin base including four unaltered opium alkaloids and 18 target compounds used within the German Heroin Analysis Program (HAP) at the Bundeskriminalamt (Federal Criminal Police Office; BKA). 12 compounds were found to be preserved unaltered through the manufacturing process. In case of 21 acetylated compounds the original alkaloid is known or could be assigned, i.e. by analysis of separately acetylated standards.

Using GC coupled to high resolution time-of-flight mass spectrometry (GC-HRTOFMS), major fragments caused by electron impact ionization (EI) were determined. The corresponding molecular weight was obtained by GC hyphenated to Fourier transform mass spectrometry mass spectrometer (FTICRMS) via atmospheric pressure chemical ionization (APCI) as soft ionization interface.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The illicit manufacturing processes for heroin are only vaguely described in the literature. Most of them rely on the Thiboumerie and Mohr process, also known as the lime method which involves the extraction of morphine using calcium oxide and ammonium chloride and subsequent acetylation with acetic anhydride [1–3]. During the isolation of morphine, other main and minor alkaloids present in opium poppy are extracted, and the subsequent chemical conversion of morphine to the corresponding diacetylmorphine

(heroin) leads to the formation of various by-products. Several publications about the formation mechanism of by-products occurring during illicit heroin manufacturing were released in the past years. They are mainly focused on acetylated products related to the major alkaloids present in opium poppy [4–6]. These minor and trace compounds present in illicit heroin generate a specific impurity profile of each batch. Comparison of seized heroin samples based on these impurities provides an important contribution to the uncovering of links amongst seized samples and thus is of substantial value for drug intelligence. Profiling methods routinely used by forensic institutes are commonly based on gas chromatographic analysis and (ultra) high performance liquid chromatography followed by quantitation of mainly acetylated

E-mail address: bjorn.ahrens@bka.bund.de (B. Ahrens)

alkaloids frequently found in illicit heroin samples [7–12]. The German Heroin Analysis Program (HAP) of the Bundeskriminalamt (Federal Criminal Police Office; BKA) comprises a determination of exterior attributes, the quantitative determination of main compounds (major opium alkaloids), adulterants, diluents, solvents and the analysis of selected organic trace impurities based on acidic extraction of the samples.

Opium, the starting material for illicit heroin manufacturing, is the dried latex of opium poppy (*Papaver somniferum*), that is obtained by scratching its crude seed vessel. According to the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) Afghanistan continued to be the largest global opium producer. Estimates suggest that up to 90% of heroin seized in Western Europe originates from Afghanistan [2,13]. In 2004 the opportunity to observe an authentic heroin manufacturing process in Afghanistan was offered to collaborators of the BKA in Germany. Besides detailed documentation of the process itself, it provided the occasion to collect authentic samples during the complete manufacturing. During the presented study the impurity profiles of these samples obtained by acidic extraction were analyzed in detail using comprehensive two-dimensional gas chromatography and high resolution mass spectrometry to provide basic information on the origin and composition of the detected impurity compounds based on which further conclusion for the heroin analysis program may be drawn.

In a proof of concept study we already demonstrated the applicability of two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOFMS) for the analysis of illicit heroin samples [14]. In the following this technique could be successfully applied in further studies on the profiling of forensically relevant samples [15–17]. GC×GC-TOFMS benefits from its very high chromatographic resolution combined with the high sensitivity and the selectivity of the mass spectrometric detection. If only unit resolution is provided by the instrument, compound identification is mainly possible by comparison of the fragmentation pattern generated by electron ionization, to mass spectral libraries. One possible solution for the characterization of unknown compounds is the implementation of high resolution spectrometry to allow for the elucidation of the elemental composition based on the accurate mass and the isotopic pattern.

During this study the samples were therefore analyzed on a gas chromatograph coupled to high resolution time-of-flight mass spectrometer system (GC-HRTOF MS). An example for the capability of the new technique in the field of forensic science was already shown [18]. The absence of an observable molecular ion for some compounds is the major drawback of electron impact ionization (EI). In order to circumvent the strong fragmentation of molecules, soft ionization techniques, such as photo ionization [19] or chemical ionization [20] have to be applied. One opportunity is atmospheric pressure chemical ionization (APCI), which was introduced in 1973 by Horning et al. and is based on pressurized nebulization into a corona discharge at atmospheric pressure [21]. The generated ionized nitrogen and water clusters cause protonation of the analytes. For the presented work, a gas chromatograph was coupled to a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FTICRMS) using APCI as interface. The ultrahigh mass resolution provided by FTICRMS system combined with the chromatographic separation (GC) and the soft ionization (APCI) is an efficient tool for the characterization of a sample and the elucidation of the elemental composition/molecular formula based on the observed molecular ion. The combination of GC×GC and GC hyphenated to high-resolution mass spectrometry was used in this study to characterize the acidic and neutral impurities in samples taken from the different steps during an authentic heroin manufacturing process to obtain basic information about the composition and origin of the impurities resulting from such a controlled synthesis.

2. Experimental

Samples from a documented authentic heroin manufacturing in Afghanistan were kindly provided by the Bundeskriminalamt. Samples were collected at all stages of the manufacturing process, starting from raw opium. The described process did not involve the processing of opium itself. As intermediates and final products the morphine base, the heroin base (brown), the heroin base (white) and the heroin hydrochloride were collected.

2.1. Manufacturing of the samples

The raw opium used was seized in Nangarhar but due to frequent distribution of opium between different provinces its actual origin is not evident. The opium was crushed, poured into barrels and dissolved in hot water while stirring. Calcium oxide (anhydrous lime) was added and left overnight. The resulting morphine solution was filtered and the residue was re-dissolved several times to increase the yield. Ammonium chloride was added and stirred until the morphine base precipitated. The morphine base was filtered the next day, subsequently air-dried and weighed for calculation of the required amount of acetic anhydride. The appropriate amount of acetic anhydride was added to the morphine base, stirred and heated for 30 min. The mixture was then poured into hot water and subsequently filtered. Sodium carbonate solution was added to the filtered solution until the brown heroin base precipitated. The heroin base was filtered out and washed twice with hot water. To convert the brown heroin base to the white heroin base, the brown base was dissolved in diluted hydrochloric acid and precipitated using diluted ammonia solution. By filtration the white heroin base was obtained. For conversion to the corresponding hydrochloride it was dissolved in a mixture of hydrochloric acid and acetone followed by filtration and evaporation on a water bath until the heroin hydrochloride precipitated. A detailed documentation is given in [22].

The described manufacturing process was based on 70 kg of four visually distinguishable batches of raw opium with a total morphine content of 8.5% (6.1–11.1%). The extracted morphine base revealed a purity of 53.1%. Finally, the brown and the white heroin base and the heroin hydrochloride revealed a purity of 68.1%, 78.5% and 74.0%, respectively. During data evaluation, particular interest was set on the brown heroin base with its acetylated alkaloids as this is the predominantly seized type of heroin in Europe.

2.2. Sample extraction

Sulphuric acid, toluene and eicosane were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Extraction was done according to the guidelines of the heroin analysis program (HAP) [8]. 250 mg of each sample was dissolved in 5 mL sulphuric acid (0.25 mol/L) and 5 mL of toluene were added. The toluene contained 10 mg/L of tetracontane as internal standard. Samples were placed in an overhead shaker for 5 min was applied followed by centrifugation for 5 min. 3.2 mL of the organic phase were evaporated to dryness under nitrogen and finally resolved in 200 µL of pure toluene. The extraction protocol was applied to the raw materials, intermediates and products of the manufacturing process.

The extracts of raw opium were additionally treated with trimethylsilyldiazomethane (TMSD) (Sigma Aldrich, Schnellendorf, Germany) prior to analysis for methylation of the fatty acids. 2.5 µL of methanol (Merck, Darmstadt, Germany) and 2.5 µL of trimethylsilyldiazomethane were added to 25 µL of opium extract. The solution was left for 20 min at room temperature and subsequently injected into the GC.

2.3. Acetylation of alkaloids

In addition laboratory syntheses were carried out by acetylation of individual alkaloids to study the resulting acetylation products. Comparison of the retention times and mass spectra of the acetylated products and the impurities of the heroin extract was used to determine the origin of unknown impurities and to reveal the basic molecular structure of these compounds.

Alkaloid standards were purchased from different suppliers: Reticuline (Toronto Research Chemicals Inc., Toronto, Canada), Thebaine (Lipomed, Weil am Rhein, Germany), Codeine and Papaverine (Merck, Darmstadt, Germany), Papaveraldine (Serva, Heidelberg, Germany), Laudanosine, Narcotin and Narceine (Ferak Berlin GmbH, Berlin, Germany). For acetylation acetic anhydride (Fluka, Steinheim, Germany) was added to the individual alkaloids and heated up for 6 h at 115 °C. Afterwards the solution was evaporated to dryness and dissolved in methanol and toluene.

2.4. Instrumentation

2.4.1. Comprehensive two-dimensional gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOFMS)

Two-dimensional gas chromatography unit resolution mass spectrometry was done on a GC×GC-TOFMS instrument (Leco, St Joseph, MI, USA) which consists of a standard gas chromatograph (6890N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a dual-stage, four-jet cryogenic (liquid N₂) modulator and a

time-of-flight mass spectrometer (Pegasus® III, Leco, St Joseph, MI, USA). A 25 m × 0.32 mm (i.d.) × 0.25 µm film thickness 5% phenyl polysilphenylene-siloxane capillary column (BPX5, SGE Analytical Science, Australia) was used in the first dimension and a 1 m × 0.1 mm (i.d.) × 0.1 µm 50% phenyl polysilphenylene-siloxane (BPX5, SGE Analytical Science, Australia) in the second dimension. The initial temperature of the GC oven was set to 90 °C for 2 min followed by an increase of 10 °C/min to 240 °C and with 4 °C/min to 350 °C. The modulation time was adjusted to 5 s. 1 µL injections were done at 300 °C using helium as carrier gas. The head pressure was ramped parallel to the oven program from 247 kPa to 488 kPa. The mass range was set to 40–550 u at an acquisition rate of 100 Hz. Additional parameters to temperature and modulation is described elsewhere [15].

2.4.2. Gas chromatography high-resolution time-of-flight mass spectrometry (GC-HRTOFMS)

Analysis was performed on a GC-HRTOFMS instrument (Pegasus® GC-HRT, Leco, St Joseph, MI, USA) which consists of a standard gas chromatograph (7890N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to a multi reflection time-of-flight mass analyzer (Leco, St Joseph, MI, USA). The high resolution TOFMS provides a mass resolution up to 50,000 and a mass accuracy less than 1 ppm during an acquisition rate of up to 200 Hz based on the novel Folded Flight Path (FFP)[™] technology.

A 5% phenyl polysilphenylene-siloxane capillary column with 30 m × 0.25 mm (i.d.) × 0.25 µm film thickness (BPX5, SGE Analytical Science, Australia) was used. The initial oven temperature was set to 160 °C (1 min) followed by an increase of 6 °C/min to 320 °C (10 min). Samples were injected at 300 °C with a constant column flow of 1.2 mL/min. Data was acquired in the high resolution mode over a mass range of *m/z* 30–510 and an acquisition rate of 25 Hz.

2.4.3. Gas chromatography hyphenated to Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry via atmospheric pressure chemical ionization (GC-APCI-FTICRMS)

A gas chromatograph (CP 3800, Agilent, former Varian Technologies, Palo Alto, CA, USA) was hyphenated to a FTICRMS system (Apex Qe Series II, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA/Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). The APCI source and FTICRMS were operated in positive mode. The transferline temperature was set to 320 °C, the sheath gas (nitrogen) was set to 0.6 mL/min and the nebulizer gas (nitrogen) to a pressure of 4 bar, respectively. The current of the corona discharge needle was adjusted to 3000 nA. 0.7 spectra per second over a mass range of *m/z* 150–600 were acquired, with a mass resolution of 160,000 @ *m/z* of 255.

The GC conditions were set as followed: A 5% phenyl polysilphenylene-siloxane capillary column 25 m × 0.25 mm (i.d.) × 0.25 µm film thickness (BPX5, SGE Analytical Science, Australia) was coupled to a 0.1 mm I.D. transfer capillary. The initial temperature of the oven was set to 160 °C (1 min) followed by an increase of 20 °C/min to 230 °C and with 3 °C/min to 320 °C for 6 min. 1 µL injections were done at 300 °C at a split ratio of 1:5 using helium as carrier gas at a flow rate of 5 mL/min.

2.5. Software and data processing

GC×GC-TOFMS data was processed using ChromaTOF® 4.32 (Leco Corporation). Compound or peak alignment is provided by the software and is done based on the first and second retention time and mass spectral data. For processing of GC-HRTOFMS data the ChromaTOF-HRT® 1.60.7 (Leco Corporation) was used. True Signal Deconvolution® for accurate peak identification is provided in both versions of the software. Further details about the data analysis of GC×GC-TOFMS and GC-HRTOFMS data are described in a previous study [15]. For mass spectral searching based on nominal masses NIST 2.0 (Gaithersburg, MD, USA) and in-house libraries of the federal criminal police office were used. For matching mass spectra with NIST a minimum matching factor of 500 (according to NIST MS search 2.0) was applied. Additionally compounds are validated by reference material and by data analysis of the GC high resolution mass spectrometric data.

Data from GC-APCI-FTICRMS experiments were processed using Compass Data Analysis 4.0 SP 5 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). Internal recalibration of mass spectra was done based on siloxanes resulting from GC column bleed which covered a mass range of *m/z* 135–540. The detected compounds and information about molecular weight, major fragment masses and relative retention time were extracted and compared with the results of the other approaches. The results are summarized in Table 1.

2.6. Workflow

In the first step known compounds were identified based on their EI mass spectra which were compared to mass spectral libraries. Mass spectral hits were verified using the accurate molecular mass information from the FTICRMS measurement, the relative retention time and manual comparison of the EI fragmentation pattern. Chromatographic comparison of the impurities of the heroin extract and the acetylated alkaloid standards were used to determine the origin of unknown impurities and to reveal the basic molecular structure of the unknowns. In a next step, the elemental composition was obtained based on the accurate molecular weight measured by FTICRMS. A molecular formula generator was included in the Compass Data Analysis software. The potential elements used for formula generation were

restricted to CHNO. Calculated sum formulas were verified manually by comparison of the theoretical and the observed isotopic pattern caused by natural occurring ¹³C, ¹⁵N and ¹⁸O isotopes. Major EI fragments were studied using GC-EI-HRTOF MS. Detected compounds were also compared to compounds described in the literature.

3. Results and discussion

With respect to the country of origin, the raw opium, the batch size, the applied manufacturing procedure and the used equipment, the samples investigated in this study can be seen as genuine. However, it cannot be ascertained whether the documented manufacturing process is typical or whether other processing methods for heroin exist in this country. Samples could be collected from all steps of the manufacturing process which offers the monitoring of impurity compounds during the entire manufacturing process. Since the samples were not adulterated as normally observed for seized street samples, all observed impurity compounds originate from the used raw material or result from the chemical process.

3.1. Stages of manufacturing

The synthesis was based on four visually distinguishable batches of raw opium. The content of the main alkaloids ranged from 6.1 to 11.1wt% for morphine (Ø 8.5wt%), 1.8 to 3.6wt% for codeine (Ø 2.7wt%), 0.6 to 2.2wt% for papaverine (Ø 1.4wt%) and 6.8 to 9.8wt% for narcotine (Ø 8.6wt%) [22]. Methanolic extracts of raw opium RO1–3 (RO4 was only analyzed for minor alkaloids due to limited sample material) were analyzed to determine the composition of minor compounds including the opium alkaloids laudanosine, reticuline, cryptopine, protopine and narceine. The differences in the proportion of these compounds (normalized to 1) for three of the opium batches can be seen from Fig. 1.

In the further course of the study only neutral and acidic compounds, covered by the applied extraction procedure, were considered. Acetylation of the morphine base during manufacturing of heroin leads to the formation of mainly acidic and neutral impurities. Hence, the standard procedure for heroin profiling is based on the extraction of these types of impurity compounds. For this reason the focus of our study was set on the impurities which are detectable via the standard profiling method. As a consequence, basic compounds were not considered, even though they can be found as impurities in the morphine and heroin base. However, some opium alkaloids, mainly papaverine, papaveraldine, narcotine and narceine, were still detectable in the acidic extracts in minor quantities.

Fig. 2 shows the impurity profiles of the different stages in the manufacturing process obtained by comprehensive two-dimensional GC. The separation in the second dimension (50% phenyl polysilphenylene – siloxane) is based on π – π interactions. Apolar compounds (e.g. FAMES) exhibit lower retention times in the second dimension than for example the more polar alkaloids and their derivatives. For better visualization a 2D apex bubble plot was used instead of the raw chromatograms. Different classes of compounds are indicated by color coding. Only qualitative information is considered, therefore a uniform size of the bubbles was chosen for representation. The acidic extracts of raw opium were dominated by fatty acids. Due to the derivatization with TMSD the corresponding fatty acid methyl esters (FAMES) which provided a better chromatographic performance, were detected in the chromatogram. They are indicated in green in Fig. 2a. In the second half of the chromatogram many steroid-type compounds eluted. Besides amides (yellow), unspecific compounds resulting i.a. from the sample preparation, such alkanes and siloxanes, were detected. They were not further considered and are indicated in grey in Fig. 2b–e. Compounds indicated in red represent target

Table 1
Impurity compounds of the (brown) heroin base obtained by acidic extraction.

Nr	Tentative identification	Rel. RT C ₄₀ = 1	Base peak EI (70 eV)	Molecular weight	Elemental composition	Err [ppm]	Origin	Reference	Type
45	Tetracontane	1.000	57.06987	561.63352 [M–H]	C ₄₀ H ₈₂	–0.44		NIST	ISTD
44	(Z)-N-Acetylanhydronarceine	0.958	193.04962	456.16529 [M+H] ⁺	C ₂₄ H ₂₅ NO ₈	0.29	Narceine	In-house	HAP
43	1-Acetoxy-N-acetyl-1,9-dihydroanhydronarceine	0.929	44.04961	515.17915 ^{a)}	C ₂₆ H ₂₉ NO ₁₀	–	Narceine	In-house	HAP
42	(E)-N-Acetylanhydronarceine	0.908	193.04964	456.16494 [M+H] ⁺	C ₂₄ H ₂₅ NO ₈	0.79	Narceine	In-house	HAP
41	UNK 381a+b	0.879	381.12069	382.12069 (e) ^{–b)}	(C ₂₁ H ₁₉ NO ₆)	0.00	Opium/Narcotine		
40	UNK 234	0.863	234.07612	234.07612 (e) ^{–b)}	(C ₂₁ H ₂₁ NO ₇)	0.15	Opium		
39	N-Acetyl-narcotine	0.850	206.08111	442.14908 [M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₃ NO ₈	0.56	Narcotine	In-house	HAP
38	UNK423 (VIII)	0.840	423.13135	424.13900 [M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₁ NO ₇	0.19			
37	UNK 412 (VIII)	0.836	412.13920	456.16529 [M+H] ⁺	C ₂₄ H ₂₅ NO ₈	0.01			
36	trans stilbene von Laudanine (VII)	0.835	137.05974	427.19891 (e) [–]	C ₂₄ H ₂₉ NO ₆	–0.07	Laudanine	[6]	
35	trans stilbene von Codamine (VI)	0.833	151.07535	427.19890 (e) [–]	C ₂₄ H ₂₉ NO ₆	–0.09	Codamine	[6]	
34	UNK 353 (V)	0.828	44.04961	354.16984 [M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	0.40			
33	UNK370 (IV)	0.823	179.07026	414.15472 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₃ NO ₇	0.02			
32	3,6-Dimethoxy-4-acetyloxy-8-(N-methyl-acetamido)ethylphenanthrene (III)	0.822	280.10941	396.18049 [M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₅ NO ₅	0.15	Thebaine	In-house	HAP
31	UNK385 (II) ^{c)}	0.815	137.05973	386.19585 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₇ NO ₅	0.89	Laudanine	[6]	
30	UNK385 (I) ^{d)}	0.813	151.07532	386.19597 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₇ NO ₅	0.60	Codamine	[6]	
29	UNK 395	0.807	280.07292	396.18068 [M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₅ NO ₅	–0.33	Thebaine		
28	UNK296	0.807	296.10446	454.18563 [M+H] ⁺	C ₂₅ H ₂₇ NO ₇	0.87		[9]	
27	trans-stilbene von Laudanosine HAP UNK 151	0.801	151.07530	400.21159 [M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₉ NO ₅	0.64	Laudanosine	[6]	HAP
26	Narceine	0.796	58.06515	445.173667 ^{a)}		–	Opium		
25	UNK295	0.765	295.09655	428.20667 [M+H] ⁺	C ₂₄ H ₂₉ NO ₆	0.21			
24	Narcotine	0.749	220.09558	414.15429 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₃ NO ₇	1.06	Opium	NIST/STD	Alkaloid
23	UNK 353 ^{e)}	0.746	86.06009	354.16981 [M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	0.50	Thebaine	[5]	
22	Papaveraldine	0.732	165.05462	354.13327 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₁₉ NO ₅	0.92	Opium	NIST/STD	Alkaloid
21	UNK322	0.722	322.10757	352.11778 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₁₇ NO ₅	0.47			
20	N-Acetyl-nor-laudanosine	0.714	192.10185	386.19597 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₇ NO ₅	0.59	Laudanosine	In-house	HAP
19	cis-stilbene von Laudanosine	0.712	44.04960	399.20419 (e) [–]	C ₂₃ H ₂₉ NO ₅	0.41	Laudanosine		
18	3-O,6-O,N-Triacetylnormorphine	0.701	87.06786	398.15993 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₃ NO ₆	–0.3	Morphine	In-house	HAP
17	UNK254(3)	0.690	254.09365	342.16984 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	0.42			
16	3,6-Dimethoxy-4-acetoxy-5-(2-(N-methylacetamido)ethylphenanthrene	0.685	265.08600	396.18055 [M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₄ NO ₅	0.99	Thebaine	In-house	HAP
15	UNK253	0.683	253.08488	345.14836 [M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₀ O ₃	0.46	Thebaine		
14	UNK254(2)	0.679	59.03651	322.14369 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	0.24	Opium		
13	3,6-Dimethoxy-4-acetoxy-9,10-dihydro-9-(N-methylacetamido)phenanthrene HAP UNK 254	0.667	254.09368	370.16491 [M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	–0.02	(Thebaine)	[9]	HAP
12	6-O,N-Diacetylnorcodeine	0.665	87.06790	370.16454 [M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	0.98	Codeine	In-house	HAP
11	HAP UNK 252	0.658	237.05456	253.08585 [M+H] ⁺ ^{b)}	(C ₁₆ H ₁₂ O ₃)	0.3			
10	UNK252	0.643	237.05459	252.07809 (e) ^{–b)}	(C ₁₆ H ₁₂ O ₃)	0.02	Opium		
9	Papaverine	0.642	338.13893	340.15411 [M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	0.66	Opium	NIST/STD	Alkaloid
8	4,6-Diacetoxy-3-methoxyphenanthrene	0.570	225.05482	324.09978 ^{a)}	C ₁₉ H ₁₆ O ₅		Thebaine/Codeine		HAP
7	UNK268	0.542	268.07306	269.08072 [M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₂ O ₄	0.43	Thebaine		
6	Acetylthebaol	0.531	254.09360	297.11199 [M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	0.5	Thebaine	In-house	HAP
5	Thebaol	0.517	254.09370	255.10145 [M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	0.46	Thebaine/Opium	In-house	HAP
4	3,6-Dimethoxy-4,5-epoxyphenanthrene	0.440	252.07785	253.08572 [M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₃	0.8	Thebaine/Opium	In-house	HAP
3	UNK 254(1)	0.439	254.09353	255.10144 [M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	0.53	Thebaine/Opium		
2	HAP UNK 204	0.414	44.04960	278.13858 [M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₉ NO ₄	0.38			HAP
1	Meconin	0.197	165.05450	194.05721 (e) [–]	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	–0.77	Opium	NIST	HAP

1st retention time refers to GC-HRT data (Tetracontane = 1).

Molecular ion/weight is based on GC-APCI-FTICRMS data [M+H]⁺ or GC-HRT data [e[–]].

^{a)} calculated, molecular ion signal to low.

^{b)} molecular ion not identified, APCI/HRT fragment.

^{c)} Most likely hydrolysis of VII.

^{d)} hydrolysis of VI.

^{e)} N-Acetyldesthebaïne.

compounds that are currently used for the impurity profiling of heroin [8]. Opium alkaloids are shown in dark grey. Narcotine, narceine, papaverine, papaveraldine, cryptopine, protopine, dihydro-sanguinarine, (methyl)codeine and laudanosine were found in the acidic opium extracts. No significant qualitative differences between the different batches of raw opium could be observed with respect to the entire impurity profile.

With respect to the opium alkaloids only papaverine, papaveraldine, narcotine and narceine were still detectable in the morphine base and the brown heroin base. In Fig. 2c impurities of the brown

heroin base are shown which mainly result from the acetylation step during manufacturing. Amongst them all 18 target compounds that Strömberg et al. selected for his study [8] indicated in red. Other compounds (blue) that could be of potential interest with respect to the impurity profiling of heroin were listed in Table 1 and investigated in more detail within this study by application of high resolution mass spectrometry. As expected only very few compounds could be detected in the purified white heroin base and the heroin hydrochloride. Target compounds Meconine, 4-O-Thebaol, 4-O-Acetylthebaol, 6-O,N-Diacetylnorcodeine, 4-Acetoxy-3,

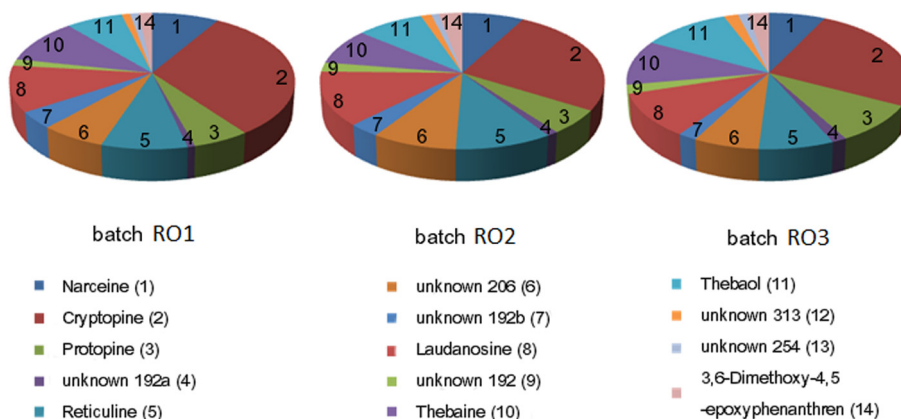


Fig. 1. Composition of minor compounds (relative peak areas) in three different batches of raw opium (1) Narceine (m/z 58), (2) Cryptopine (m/z 148), (3) Protopine (m/z 148), (4) unknown (m/z 192), (5) Reticuline (m/z 192), (6) unknown (m/z 206), (7) unknown (m/z 192), (8) Laudanosine (m/z 206), (9) unknown (m/z 192), (10) Thebaine (m/z 311), (11) Thebaol (m/z 254), (12) unknown (m/z 313, 255), (13) unknown (m/z 254), (14) 3,6-Dimethoxy-4,5-epoxyphenanthrene (m/z 237).

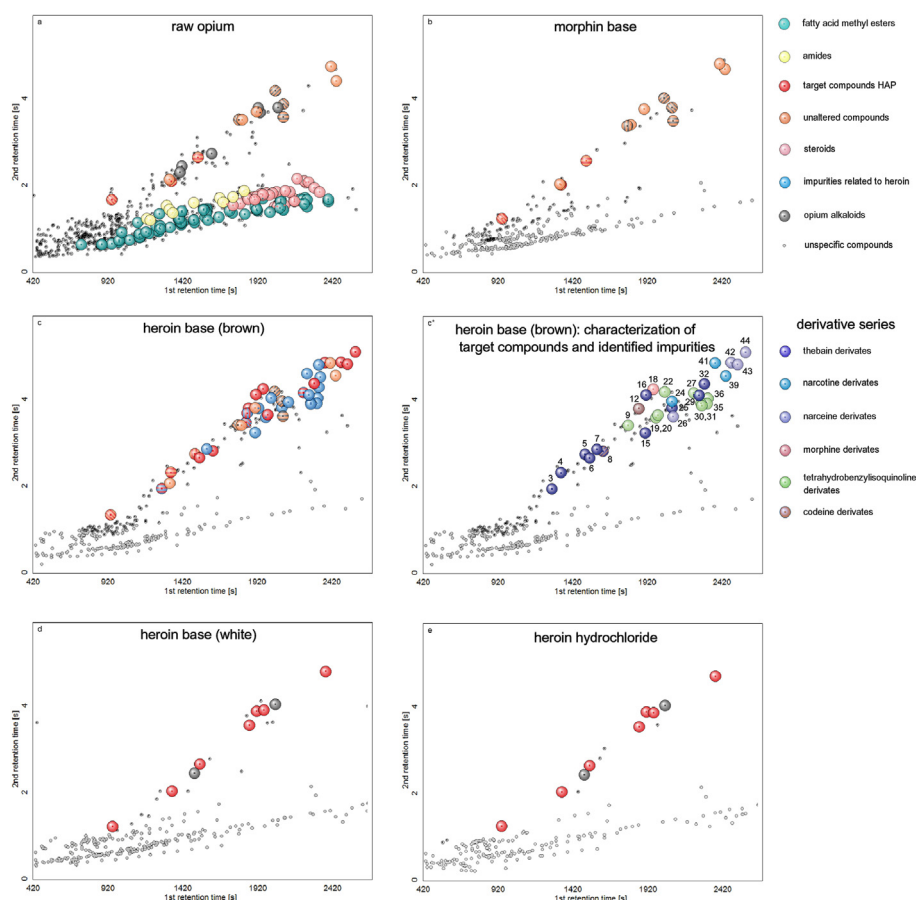


Fig. 2. Apex bubble plots of the acidic extracts of the different stages of manufacturing obtained by comprehensive two-dimensional GC. a) raw opium b) morphine base c) heroin base (brown) d) heroin base (white) e) heroin hydrochloride; [a–e] red: target compounds HAP, see Table 1, black: opium alkaloids, orange: unaltered in all manufacturing steps (until brown heroin base), yellow: amides, green: fatty acid methyl esters (FAMEs), pink: steroids, blue: further impurities of the heroine base; [c] heroin base (brown): characterization of target compounds and identified impurities; brown: codeine-derivatives; light green: tetrahydrobenzylisoquinoline derivatives; dark blue: thebaine-derivatives; pink: morphine-derivative; turquoise: narcotine derivatives; purple: narceine-derivatives; assigned numbers according compound numbers in Table 1.

6-dimethoxy-5-[2-(N-methyl-acetamido)]ethylphenanthrene, 3-O,6-O,N-Triacetylnormorphine and N-Acetylnarcotine were found amongst them. Colorless bubbles represent unknown compounds not further considered. The affiliation to more than one class is indicated by striped bubbles. The white heroin base is commonly not available on the illicit market; therefore in the following the focus was set on the brown heroin base.

3.2. Unaltered impurity compounds derived from opium

Neutral and acidic compounds which are preserved qualitatively during the entire manufacturing process up to the brown heroin base are assigned in orange in Fig. 2. Besides some of the main opium alkaloids, papaverine and narcotine, minor alkaloids and other compounds such as papaveraldine, narceine, thebaol,

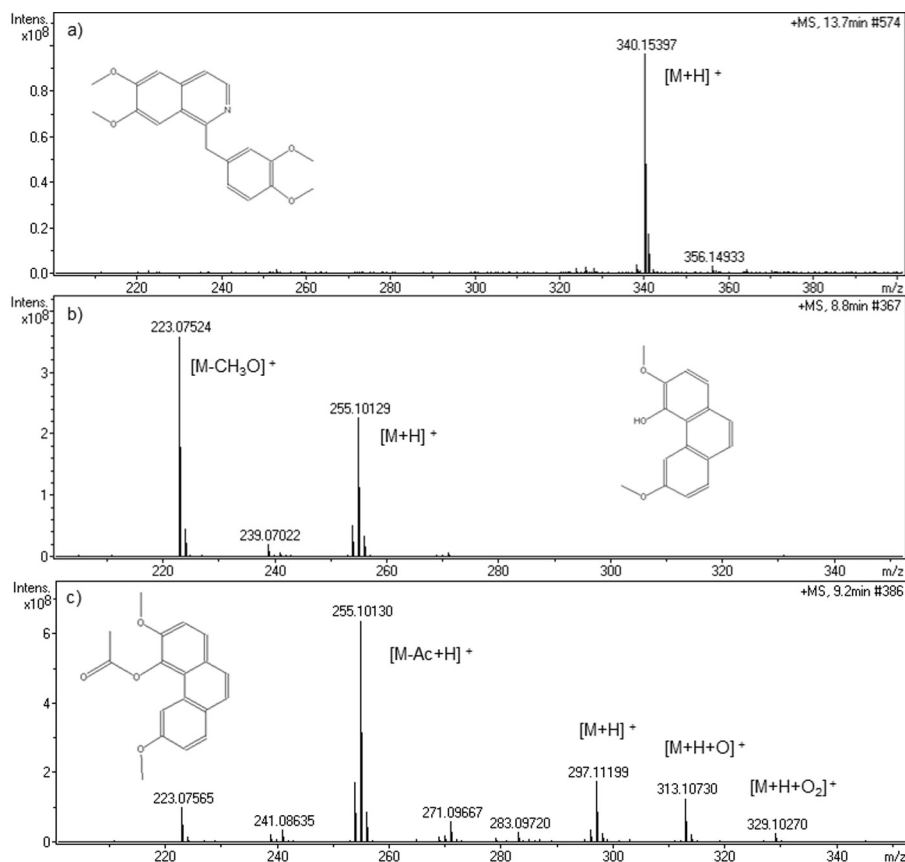


Fig. 3. Impact of APCI on different molecular structures a) papaverine b) thebaol c) acetylthebaol.

meconine and 3,6-dimethoxy-4,5-epoxy-phenanthrene were found. Although 3,6-dimethoxy-4,5-epoxy-phenanthrene is described as impurity resulting from the acetylation of thebaine, it was already detected in the raw opium [5,23]. Other persistent compounds showed no spectral match with the libraries. The unknown compounds UNK-254(1), UNK-252, UNK-254(2), UNK-234 and UNK381a+b were therefore investigated in more detail using high resolution mass spectrometry, see also Table 1.

3.3. APCI of acetylated derivatives

Acetylated derivatives of opium alkaloids mostly undergo strong fragmentation when subjected to electron impact (EI) ionization and they often do not provide a molecular ion, therefore preventing the generation of the corresponding sum formula from that data. APCI was used as soft ionization source and interface between the gas chromatograph and the FTICRMS. However, the major drawback is the lower acquisition rate caused by the required period of time in which the ion is confined in the ICR cell. Optimization of the APCI and FTICRMS related parameters for our measurements resulted in an acquisition rate of 0.7 spectra per second.

As the predominantly chemical reaction in the APCI source, the protonation of the molecular ion occurred. The ionization technique APCI is not as soft as, e.g. electrospray ionization (ESI), and thus, depending on the molecule, fragmentation could be observed. The impact of atmospheric pressure chemical ionization on the different molecular structures is shown in Fig. 3. For non-acetylated compounds, e.g. papaverine (A), only the protonated molecular ion with a mass-to-charge ratio of 340.154 (molecular mass of 339.147) is observed. Thebaol (B) showed the protonated molecular ion (m/z 255.101) and one main fragment with m/z 223.075

which could be attributed to the loss of a methoxy-group. The 223.075 fragment was also observed for 3,6-dimethoxy-4,5-epoxy-phenanthrene which possesses the same phenanthrene structure with methoxy-groups attached. In case of acetylthebaol (C) the major peak observed is caused by the loss of the acetyl-group. The molecular ion (protonated) was observed three times lower compared to the base peak. Besides some minor fragments which were also observed for thebaol (m/z 223.075, m/z 239.070, m/z 241.086), the 1st and 2nd oxygenated states (m/z 313.107, m/z 329.102) of the molecular ion were detected. In general, the most pronounced fragmentation behavior was observed for phenanthrene-type heroin impurities. Besides, the signal intensity of these compounds was observed to be lower using APCI compared to EI ionization. As major APCI-fragments characteristic for these compounds, m/z 223.075 and m/z 255.101 were observed. For phenanthrene-type compounds with an acetamido-group, m/z 354.169 was observed as major fragment. The abundance of the molecular ion was in most cases lower compared to the base peak. This implicated some difficulties as for some compounds the molecular weight could not be unambiguously identified and the elucidation of the elemental composition was therefore prevented. The mass accuracy was verified based on known compounds. An error < 1 ppm was observed for most of the molecular ions.

In Fig. 4 the mass spectra of N-Acetylnornarcotine and 3,6-Dimethoxy-4-acetoxy-5-(2-(N-methylacetamido))ethylphenanthrene obtained by the three analytical techniques are shown. For N-Acetylnornarcotine no molecular ion is observed using EI ionization. Likewise 3,6-Dimethoxy-4-acetoxy-5-(2-(N-methylacetamido))ethylphenanthrene undergoes strong fragmentation, however, the molecular ion is still observable using EI. Automated peak deconvolution is integrated in both versions of the ChromaTOF™ software (for GC×GC-TOFMS and GC-HRTOFMS). Based on the

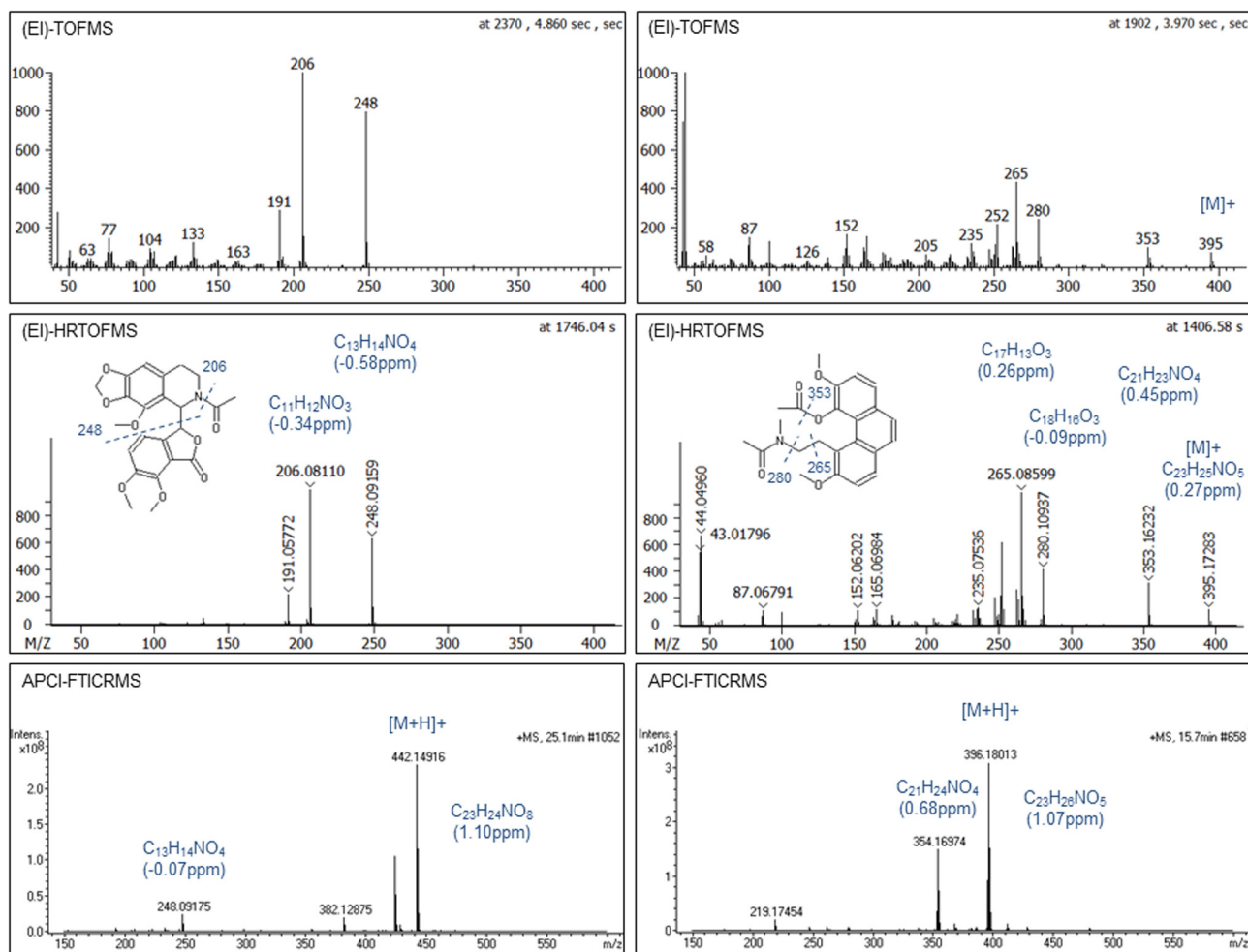


Fig. 4. Acquired mass spectra of N-Acetylnarcotine (left) and 3,6-Dimethoxy-4-acetoxy-5-(2-(N-methylacetamido))ethylphenanthrene (right) acquired with (EI)-TOFMS (upper part), (EI)-HRTOFMS (middle part) and APCI-FTICRMS (lower part).

enhanced separation using multi-dimensional GC peak deconvolution and combination with-HRTOFMS data the compound identification is improved. The sum formulas of important fragments can be determined based on the accurate mass using (EI)-HRTOFMS. Using APCI-FTICRMS fragmentation is significantly reduced and the protonated molecular ion usually shows the highest (or second-highest) abundance in the mass spectra.

3.4. Impurities in heroin base obtained by acidic extraction

The focus was set on 44 compounds which were present in adequate quantities in the (brown) heroin base. In Table 1 all available details on these compounds are given. 23 of the compounds, opium alkaloids and compounds which are part of the impurity profiling of the Heroin Analysis Program (HAP), are unambiguously identified. They are assigned as HAP targets ('HAP') or 'alkaloid' in the last column. A few other compounds were tentatively identified based on published EI mass spectra from the literature [5,6,10]. The relative retention time is based on n-tetracontane as internal standard (C40 = 1.00) and refers to the one-dimensional GC-HRTOFMS measurements. The accurate mass of the base peak was also determined with the HRTOF system. The corresponding molecular ion of each compound was mainly determined by APCI-FTICRMS. The values given in Table 1 refer to the protonated molecular ion as this was the most prominent chemical reaction in the APCI source. The given sum formula refers to the neutral molecule. One difficulty observed with APCI ionization of the stud-

ied compounds is the more pronounced fragmentation of phenanthrene-type compounds as described in the previous section. In case of four *unknown* compounds the corresponding molecular ion could not be unambiguously identified.

For further characterization of unknown acetylation derivatives, alkaloid standards were acetylated separately and analyzed by GC×GC. Comparison of the retention times and mass spectra of the heroin impurities and the acetylated products was used to determine the origin of unknown impurities, see the column entitled with 'origin' in Table 1. This is discussed in the following in more detail. In Fig. 2c (2) heroin impurities are classified and assigned by colored bubbles according to their related basic alkaloid structure. Structures of main opium alkaloids and their corresponding acetylation products that could be confirmed by the acetylated standards are shown in Fig. 5.

3.5. Impurity compounds related to phenanthrene-derived alkaloids

Thebaine undergoes strong rearrangement when subjected to acetic anhydride as described in the literature [5,24]. Thus the acetylation of thebaine led to the formation of many impurities as it could be observed from the chromatographic analysis. Thebaine was no longer detectable in the acetylated sample. 3,6-Dimethoxy-4,5-epoxyphenanthrene, acetylthebaol and one compound, tentatively identified as N-acetyldesthebaol [5], revealed high quantities. Various minor and trace impurities were present. By comparison of the retention times and mass spectra eleven com-

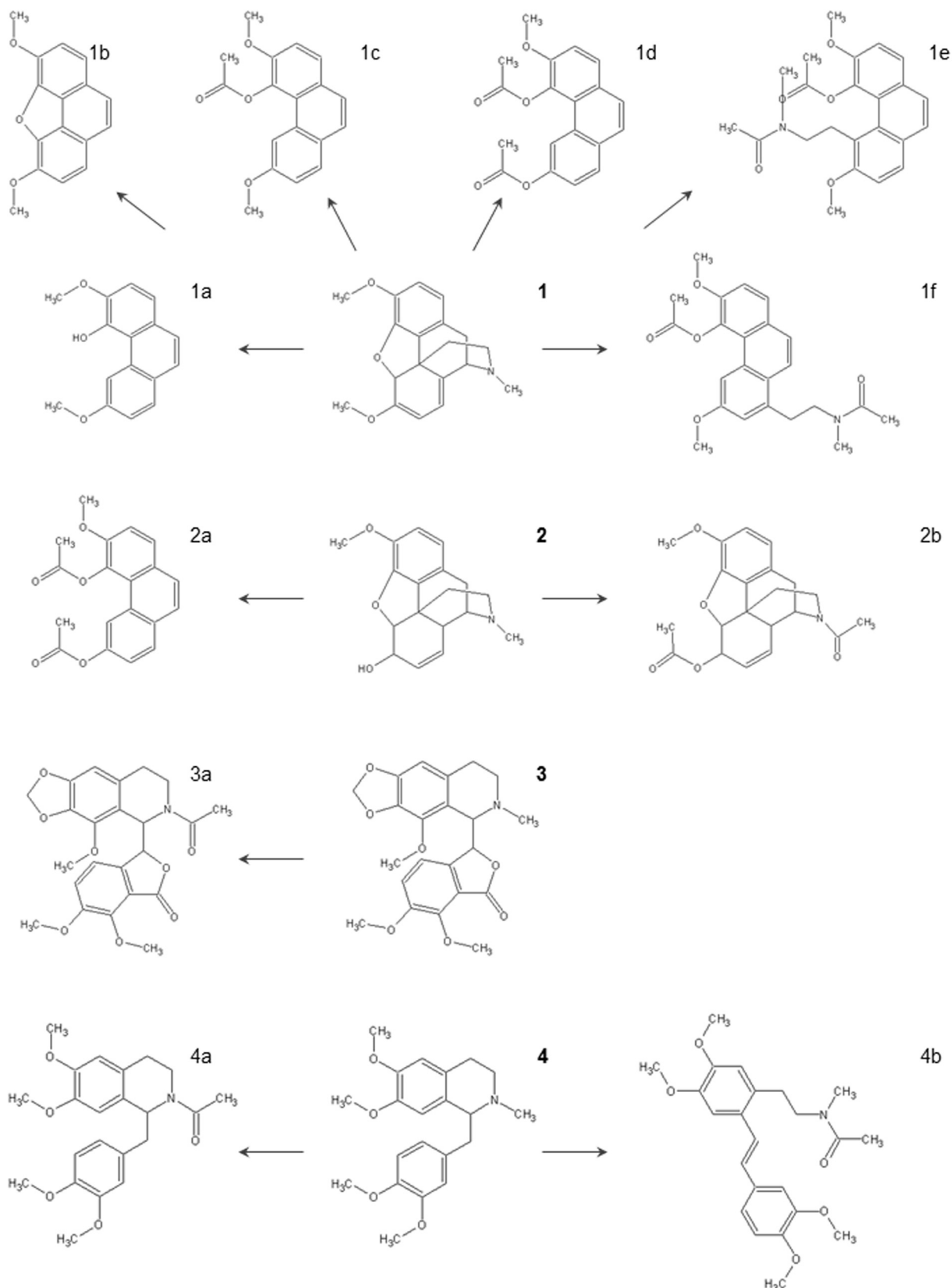


Fig. 5. Structures of main alkaloids and their corresponding acetylation products that were present in the (brown) heroin base and confirmed by separately acetylated standards. 1. Thebaine 1a. Thebaol 1b. 3,6-Dimethoxy-4,5-epoxyphenanthrene 1c. Acetylthebaol 1d. 4,6-Diacetoxy-3-methoxyphenanthrene 1e. 4-Acetoxy-3,6-dimethoxy-5-[2-(N-methylacetamido)]ethylphenanthrene 1f. 4-Acetoxy-3,6-dimethoxy-8-[2-(N-methylacetamido)]ethylphenanthrene; 2. Codeine 2a. 4,6-Diacetoxy-3-methoxyphenanthrene 2b. 6-O,N-Diacetylnorcodeine; 3. Narcotine 3a. N-Acetylnornarcotine; 4. Laudanosine 4a. N-Acetylnorlaudanosine 4b. cis-/trans-stilbene of Laudanosine [6].

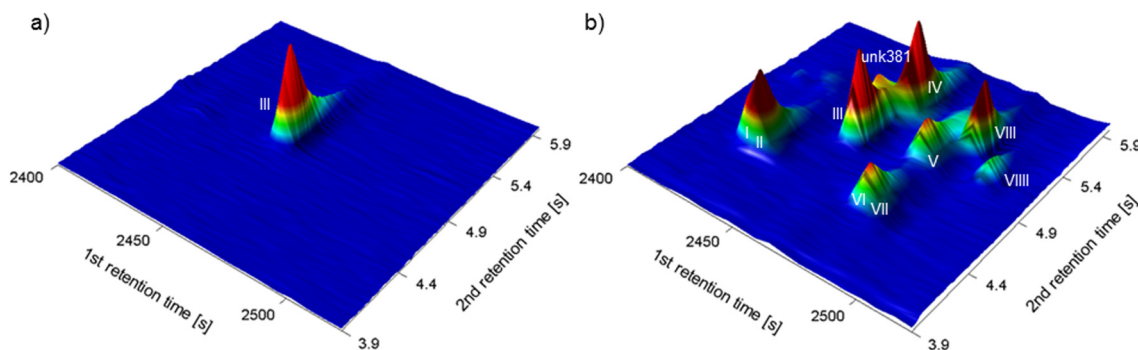


Fig. 6. Part of the two-dimensional chromatogram of an acidic extract of the (brown) heroin base a) considering only HAP target compounds b) TIC signal. VI: *trans*-stilbene of codamine; VII: *trans*-stilbene of laudanine; I: hydrolysis of VI; II: hydrolysis of VII; III: 4-acetyloxy-3,6-dimethoxy-8-[2-(N-methyl-acetamido)]ethylphenanthrene.

pounds present in the extract of the heroin could be related to the acetylation of thebaine. Compounds which were detected only in very small quantities were not further considered. Besides known compounds, such as 3,6-dimethoxy-4,5-epoxyphenanthrene, 4,6-diacetoxy-3-methoxyphenanthrene, 4-O-thebaol, 4-O-acetylthebaol, 4-acetoxy-3,6-dimethoxy-5-[2-(N-methyl-acetamido)]ethylphenanthrene and 4-acetoxy-3,6-dimethoxy-8-[2-(N-methyl-acetamido)]ethylphenanthrene which are included in the list of target compounds (HAP), several other compounds were found. One of the unknowns could be tentatively identified as N-acetyldesthebaïne which is described in the literature [5,23]. UNK 254(1) is assumed to be a structural isomer of 4-O-thebaol due to the same molecular formula, similar mass spectra and the fact that it could be also detected in opium and morphine. For UNK268 an elemental composition of $C_{16}H_{12}O_4$ was calculated. For UNK253 a molecular mass of 345.148 with the corresponding formula of $C_{23}H_{20}O_3$ was found. Closely to 4-acetoxy-3,6-dimethoxy-8-[2-(N-methyl-acetamido)]ethylphenanthrene a compound with a similar mass spectra and the same elemental composition of $C_{23}H_{25}NO_5$ eluted. However, an unambiguous identification of the four unknown (UNK) compounds needs further investigation.

3,6-Dimethoxy-4-acetoxy-9,10-dihydro-9-(N-methylacetamido)phenanthrene and UNK353 were not detected in the acetylated thebaine sample but they are supposed to be derived from thebaine due to structural or mass spectral similarity. 3,6-Dimethoxy-4-acetoxy-9,10-dihydro-9-(N-methylacetamido)phenanthrene is reported in the literature and is one of the HAP targets, formerly assigned as unknown 254 [8,10].

The acetylation of codeine resulted mainly in the formation of O-acetylcodeine and 6-O,N-diacetylnorcodeine. Further trace compounds related to codeine were not detected in the investigated heroin sample.

3.6. Impurity compounds related to benzyloisoquinolinealkaloids

The acetylation of laudanone and reticuline generates several neutral and acidic impurity compounds. Together with the acetylation products of codamine and laudanine, these compounds as well as their formation pathways and frequent occurrence in seized heroin, were described in detail by Toske et al. [6]. Regarding the acetylation of reticuline, none of the resulting products could be detected in the heroin investigated in our study. Compounds resulting from the acetylation of laudanone, N-acetyl-nor-laudanone and the *trans*-stilbene of laudanone (formerly HAP unknown 151) were therefore found in large quantities. The *cis*-isomer of the stilbene compound was also present, but its

abundance was lower by a factor of 50 compared to the *trans*-isomer. Based on the accurate mass of the molecular ions and by comparison of the mass spectral data to the literature [6], the *trans*-stilbene of laudanone (VII) and codamine (VI) could be tentatively identified. Two further compounds (I and II) most likely refer to the respective hydrolysis products of VI and VII. In this case literature provided only mass spectra of the derivatized compounds [6]. In Fig. 6 the corresponding part of the GCxGC chromatogram is shown. Fig. 6a illustrates this part of the chromatogram considering only target compounds known from HAP. In the selected retention window only 4-acetyloxy-3,6-dimethoxy-8-[2-(N-methyl-acetamido)]ethylphenanthrene (III) elutes. In Fig. 6b the corresponding TIC signal is shown revealing the presence of ten compounds that elute within the defined retention window. The derivatives of laudanone and codamine (stilbene compounds and their hydrolysis products) showed very similar retention times in both dimensions.

The acetylation of narcotine and narceine generated a few impurity compounds, however, apart from compounds that appear already in the HAP target list, namely N-acetylnarcotine, (E)-N-acetylanhydronarceine, (1R,9S)-1-Acetoxy-N-acetyl-1,9-dihydro-anhydronarceine and (Z)-N-Acetylanhydronarceine, no further compounds were detected in the investigated heroin sample. UNK381 (isomer) was found in the acetylated narcotine sample, however, this compound(s) were also found in the raw opium and morphine. Therefore it is not considered as an acetylation product.

3.7. Unknowns

Several of the heroin compounds could not be related to impurities generated during the acetylation of individual alkaloids. Some of them are discussed in the following. For the HAP UNK 204 a molecular ion of m/z 277 could be assigned. According to the accurate mass measured by GC-HRTOFMS and GC-APCI-FTICRMS the corresponding formula is $C_{15}H_{19}NO_4$. The base peak of m/z 204 is due to the loss of m/z 73 (C_3H_6NO , acetamidogroup) which most probably results from the acetylation of a tertiary amine. For UNK 252(HAP) only fragments (m/z 223.075, m/z 253.086) could be observed in the FTICRMS spectra, the molecular ion could not be unambiguously identified. As discussed in a previous section, stronger fragmentation in the APCI source was observed for phenanthrene-type compounds. In case of UNK252, which is also present in opium, no peak could be observed in the GC-FTICRMS chromatogram, most probably due to the comparable lower concentration in addition to the poor APCI ionization efficiency. For UNK254(3) an elemental composition of $C_{20}H_{23}NO_4$

was determined. The corresponding base peak of 254.0936 could be attributed to the loss of a C_4H_5NO side chain. UNK322 revealed a similar mass spectrum as papaveraldine, however, the elemental composition as well as some mass fragments showed -2H less indicating a ring closure. The unknown compound UNK296 with a base peak of 296.104 and the elemental composition of $C_{25}H_{27}NO_7$ was also mentioned in the literature [10]. The elemental composition of further unknown compounds can be seen from Table 1.

4. Conclusion

Impurity compounds obtained by acidic extraction of samples taken at different stages in the authentic and documented illicit manufacturing process of heroin from Afghanistan were analyzed by comprehensive two-dimensional gas chromatography. The technique benefits from the increased chromatographic separation that, in combination with the spectral continuity and high acquisition rate of the TOF system, enhances the performance of the deconvolution and improves data reliability.

Besides the characterization of the entire manufacturing process based on the impurity composition, 44 impurity compounds found in the brown heroin base were analyzed in detail to provide basic information about their elemental composition and origin. Those included 18 target compounds used within routinely applied profiling programs such as the German Heroin Analysis Program. Twelve compounds, amongst them four opium alkaloids, were found to be directly derived from the raw opium used; they were preserved unaltered through the manufacturing process. For 21 acetylated derivatives, the original alkaloid was known or could be determined during this study providing basic information on the impurities' origin. Some of the reported *unknown* compounds were found to be present in moderate or high abundance (e.g. UNK254(3)) in the brown heroin base.

For elucidation of the elemental composition of unknown compounds, GC hyphenated to high resolution mass spectrometry was used. GC-(EI) HRTOFMS provided accurate masses that enabled the generation of molecular formulas of major peaks in the mass spectra. Due to the frequent absence of an observable molecular ion using EI ionization the elucidation of the elemental composition of the molecule was often prevented. FTICRMS provided ultrahigh mass resolution and in combination with APCI it provided the accurate molecular mass for elucidation of the elemental composition of most of the unknown compounds investigated during this study.

Acknowledgments

This work was funded by the German ministry of education and research (BMBF) as part of the collaborative security research project MIME (FKZ 13N12007).

References

- [1] United Nations, Recommended Methods for Testing Opium, Morphine and Heroin: Manual for Use by National Drug Testing Laboratories, United Nations, New York, 1998.
- [2] United Nations, The Opium Economy in Afghanistan -- An International Problem United Nations, New York, 2003.
- [3] United Nations, Clandestine Manufacture of Substances Under International Control: Manual for Use by National Law Enforcement and Narcotics Laboratory Personnel, United Nations, New York, 1998.
- [4] A.C. Allen, D.A. Cooper, J.M. Moore, M. Gloger, H. Neumann, Illicit heroin manufacturing byproducts: capillary gas chromatographic determination and structural elucidation of narcotine- and norlaudanosi-related compounds, *Anal. Chem.* 56 (1984) 2940–2947.
- [5] A.C. Allen, D.A. Cooper, J.M. Moore, C.B. Teer, Thebaine rearrangements: nonclassical D ring migrations, *J. Org. Chem.* 49 (1984) 3462–3465.
- [6] S.G. Toske, S.D. Cooper, D.R. Morello, P.A. Hays, J.F. Casale, E. Casale, Neutral heroin impurities from tetrahydrobenzylisoquinoline alkaloids, *J. Forensic Sci.* 51 (2006) 308–320.
- [7] H. Neumann, M. Gloger, Profiling of illicit heroin samples by high-resolution capillary gas chromatography for forensic application, *Chromatographia* 16 (1982) 261–264.
- [8] L. Strömberg, L. Lundberg, H. Neumann, B. Bobon, H. Huizer, N.W. van der Stelt, Heroin impurity profiling – a harmonization study for retrospective comparisons, *Forensic Sci. Int.* 114 (2000) 67–88.
- [9] I.S. Lurie, S.G. Toske, Applicability of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for heroin profiling, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 322–326.
- [10] D.R. Morello, S.D. Cooper, S. Panicker, J.F. Casale, Signature profiling and classification of illicit heroin by GC-MS analysis of acidic and neutral manufacturing impurities, *J. Forensic Sci.* 55 (2010) 42–49.
- [11] B. Debrus, J. Broseus, D. Guilleme, P. Lebrun, P. Hubert, J.L. Veuthey, P. Esseiva, S. Rudaz, Innovative methodology to transfer conventional GC-MS heroin profiling to UHPLC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2719–2730.
- [12] I.S. Lurie, S.E. Driscoll, S.S. Cathapermal, S. Panicker, Determination of heroin and basic impurities for drug profiling by ultra-high-performance liquid chromatography, *Forensic Sci. Int.* 231 (2013) 300–305.
- [13] United Nations, World Drug Report, United Nations, New York, 2012.
- [14] T. Gröger, M. Schäffer, M. Pütz, B. Ahrens, K. Drew, M. Eschner, R. Zimmermann, Application of two-dimensional gas chromatography combined with pixel-based chemometric processing for the chemical profiling of illicit drugs, *J. Chromatogr. A* 1200 (2008) 8–16.
- [15] M. Schäffer, T. Gröger, M. Pütz, S. Dieckmann, R. Zimmermann, Comparative analysis of the chemical profiles of 3,4-methylenedioxyamphetamine based on comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, (GCxGC-TOFMS), *J. Forensic Sci.* 57 (2012) 1181–1189.
- [16] M. Schäffer, T. Gröger, M. Pütz, R. Zimmermann, Forensic profiling of sassafras oils based on comprehensive, two-dimensional gas chromatography, *Forensic Sci. Int.* 229 (2013) 108–115.
- [17] M. Schäffer, T. Gröger, M. Pütz, R. Zimmermann, Assessment of the presence of damiana in herbal blends of forensic interest based on comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Forensic Toxicol.* 31 (2013) 251–252.
- [18] LECO Corporation, Saint Joseph, Michigan USA, 2011.
- [19] M.S. Eschner, W. Welthagen, T.M. Gröger, M. Gonin, K. Fuhrer, R. Zimmermann, Comprehensive multidimensional separation methods by hyphenation of single-photon ionization time-of-flight mass spectrometry (SPI-TOF-MS) with GC and GCxGC, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1435–1445.
- [20] B. Munson, Chemical ionization mass spectrometry: ten years later, *Anal. Chem.* 49 (1977) 772A–775A.
- [21] E.C. Horning, M.G. Horning, D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure, *Anal. Chem.* 45 (1973) 936–943.
- [22] U. Zerell, B. Ahrens, P. Gerz, Documentation of a heroin manufacturing process in Afghanistan, *Bull. Narcotics LVII* (1&2) (2005) 11–31.
- [23] I.S. Lurie, A.C. Allen, Isolation, separation and detection via high-performance liquid chromatography of acidic and neutral acetylated rearrangement products of opium alkaloids, *J. Chromatogr. A* 317 (1984) 427–442.
- [24] C. Bertgen, W. Fleischacker, F. Vieböck, Acyl-normethine aus Thebain, *Chem. Ber.* 100 (1967) 3002–3015.

**Application of gas chromatography ultra-high resolution
mass spectrometry for analysis of bitumen aging
processes**

von

Theo Schwemer, Uwe Käfer, Christopher P. Rüger, Martin Sklorz, Ralf Zimmermann

Application of gas chromatography coupled to ultra-high resolution mass spectrometry for the analysis of bitumen aging

Theo Schwemer^{†,‡,§}, Uwe Käfer^{†,‡,§,§}, Christopher P. Rüger^{†,§}, Martin Sklorz^{†,§}, Ralf Zimmermann^{†,‡,§}

[†]Joint Mass Spectrometry Centre/Chair of Analytical Chemistry, University of Rostock, 18051 Rostock, Germany

[‡]HICE – Helmholtz Virtual Institute of Complex Molecular Systems in Environmental Health – Aerosols and Health, 85764, Neuherberg, Germany, www.hice-vi.eu

[§]Joint Mass Spectrometry Centre/Cooperation Group Comprehensive Molecular Analytics, Helmholtz Zentrum München, 85764, Neuherberg, Germany

^{§§}ASG Analytik-Service Gesellschaft mbH, 86356 Neusäss, Germany

Corresponding author: Christopher P. Rüger (christopher.rueger@uni-rostock.de)

Declarations of interest: none

Highlights

- First study of bitumen with GC coupled to ultra-high resolution MS
- Detected and assigned elemental compositions for compounds in a m/z interval of 200 – 700
- Depletion of carboxylic acid esters during aging process between 20 – 70%
- Gas chromatography revealed that at least 70% of found mass traces are isomeric species

Abstract

In this study, bitumen aging is investigated by analyzing its semi-volatile and low-volatile constituents. For this purpose, a modified rotary flask aging method was deployed and the sample material was analyzed by gas chromatography coupled to chemical ionization ultra-high resolution mass spectrometry (GC-APCI FT-ICR MS). Samples were injected directly by a programmed temperature vaporizer and separated on a thin film high temperature column. Additionally, a silylation step is applied prior to analysis, to raise the upper volatility limit of GC-detectable compounds.

Despite bitumen being a vacuum residue, more than 2,000 elemental compositions could be detected in a m/z interval of 200 - 700. Gas chromatography revealed that at least 70% of the mass traces are isomeric compounds. During the bitumen aging

process, the content of carboxylic esters is mainly affected by volatilization. In this respect compounds with a carbon number of up to 38 are depleted, independently of their chemical nature. Additionally, the formation of sulfoxide compounds could be found. The derivatization allowed to reveal the formation of further non-volatile oxidation products such as polyols.

GC FT-ICR MS was successfully applied for the non-targeted study of bitumen aging towards low- and semi-volatile components. Although bitumen has only a minor portion accessible to gas chromatography, the separation step prior to high-resolution mass spectrometry allowed to identify evaporation and oxidation processes during bitumen aging. The additional applied silylation enables the extension of the detectable compound spectrum and improves the assignment of substance species.

Keywords

bitumen, aging, gas chromatography, ultra-high resolution mass spectrometry, Atmospheric pressure chemical ionization, FT-ICR MS

1. Introduction

Bitumen is a highly complex material consisting of a vast variety of chemical compounds that mostly belong to high-molecular-weight hydrocarbons containing several heteroelements, such as oxygen, nitrogen, and sulfur. Hence, the physicochemical properties of bitumen depend on the chemical composition, as well as on the structure of their constituents. The composition is significantly affected by the origin, production cycle, additional treatments. Furthermore, additives are commonly added to the bitumen to adjust specific physicochemical properties, such as hardness, brittleness, and viscosity. As a consequence of the complex composition, specification and normative classification are based on physical measures (Weigel and Stephan, 2017). Nowadays, bitumen primarily is obtained as vacuum distillation residue of the crude oil refinery process (Le Guern et al., 2010). It is used by the paving industry in a scale of about 100 Megatons per year. Approximately 85 w-% is used as binder for asphalt to construct roads and paved areas. Other applications are roofing or sealing and insulating purposes (Eurobitume, 2015). Thereby, aging is an essential and critical factor in the product lifecycle. Compounds in bitumen and the whole asphalt mixtures (consisting of bitumen, mineral aggregates, additives, and fillers) will alter over time (Littke et al., 1991; Petsch et al., 2000), which influences the properties. For instance thermal and photochemical oxidation (Branthaver et al., 1993; Petersen, 2009; Baek et al., 2012; AlHumaidan et al., 2016), volatilization, exudation as well as decomposition (Garrett et al., 1998; Smith et al., 2009) were proven by several studies. In regard to environmental pollution, in particular air pollution, it also is of concern, which substances can be released by the asphalt.

Since the 1960s, several investigations concerning the chemical structure, the oxidation, and aging of bitumen have been carried out (Petersen, 2009). However, it turns out that bulk-analytical methods can only provide limited information about complex chemical changes during the aging process. Due to the complexity of the sample matrix, the investigation of the chemical interactions at a molecular level and their effects on the physical and chemical properties is still a challenging task (Petersen, 2009). In a compositional analysis of oil residues by ultrahigh-resolution mass spectrometry, more than 26,000 species with different m/z ratios were revealed for an asphaltene fraction (Kekäläinen et al., 2013). Keeping the corresponding mass range from m/z 200 to 1,000 in mind, this indicated for every nominal mass an average number of 32 elemental compositions. In addition, every elemental composition may represent a high number of isomeric species. The advantages of high-resolution mass spectrometry for the characterization of high-complex materials on the molecular level such as environmental samples or petroleum have been exhaustively shown (Klein et al., 2006b; Lesueur, 2009; Lemkau et al., 2014; Huba and Gardinali, 2016). Adding chromatographic separation, this information can be extended by isomeric species.

Commonly, the sample complexity is reduced prior to analysis by fractionation according to solubility and polarity into the four fractions: saturates, aromatics, resins and asphaltenes (SARA) (Klein et al., 2006a; Cho et al., 2011; Gaspar et al., 2012; Handle et al., 2017). In this study, we aim to decipher the low- and semi-volatile constituents of bitumen by gas chromatography (GC) to unravel

correlations between volatility and its impact on the composition supported by isomeric information. It was already shown that the approach is suitable to characterize petroleum-related products (Barrow et al., 2014; Schwemer et al., 2015; Zuber et al., 2016), but so far bitumen had never been investigated by this technique.

On a first glance, the analysis of a tar-like high-viscous material by gas chromatography will only tackle a minor portion of the bitumen. Nonetheless, at higher temperatures volatile and semi-volatile constituents, such as saturated hydrocarbons, hydrogen sulfide, other thiols as well as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are released from the bitumen in a considerable amount (Brandt, H., and P. De Groot, 1996). To improve the detection level of compounds we used an atmospheric pressure chemical ionization source, which enables the application of carrier gas flow rates far beyond the conventional carrier gas flows of vacuum sources. This could not only extend the range of compounds amenable for GC (Fialkov et al., 2003), it also improves the sensitivity by increasing the number of analyte ions in the ion source.

The treatment of residues by exposure to air at elevated temperatures ($> 150^{\circ}\text{C}$) is a widespread method to modify their physical properties during the manufacturing process. Thereby, the combination of heat and oxidation had significant effects on the physical and chemical properties of bitumen (Traxler, 1963; Petersen, 1994). The changes of the chemical composition and related reactions during this process are far from being completely understood. From a health perspective, the World Health Organization (WHO) concluded in their IARC monograph 103 (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans et al., 2013) a higher probability of carcinogenicity for fully oxidized bitumen compared to straight run and hard bitumen. Consequently, the degree of oxidation will affect the toxicity of bitumen. By multiple pathways, e.g., weathering or abrasion, the aged compounds can be transferred to fine particulate matter (fine dust), which can then interact with human body. To clarify, which aerosol fraction or property is involved in the induction of the observed adverse health effect, the HICE-project (www.hice-vi.eu) of the Helmholtz organization conducted a comprehensive study (Oeder et al., 2015; Rüger et al., 2015b; Sapcariu et al., 2016). As part of this project, we focus on the investigation of changes in the chemical composition of semi-volatile compounds and how they are affected by bitumen aging.

2. Materials and methods

Sample preparation

The simulated aging procedure is conducted according to a modified rotating flask test in a rotary evaporator. In brief, 200 g of a 70/100 bitumen are heated in a 1 L round bottom flask at 150°C for 48 h under air-flow of 2 L/min and a rotation speed of 20 rotations per minute, obtaining the aged bitumen investigated within this study.

Prior to analysis, the untreated and the aged bitumen were dissolved in dichloromethane (Sigma-Aldrich, $\geq 99.9\%$) in a ratio of 1:20 w-%. To extend the accessible chemical space of polar constituents in the bitumen samples, a silylation step was performed giving a second sample set for analysis. 1 μL of diluted sample is transferred into a 100 μL vial-insert, and 10 μL of N,O-

Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) (Sigma-Aldrich, Supelco, for GC derivatization, $\geq 99\%$) are added. Reaction took place at 50°C for 30 min, while shaking every 10 min for 30 s with a vortex mixer. This extend the range of detectable species and converts some thermally sensitive substances into more stabile products like the conversion from acids into silyl-ester.

Chromatographic and mass spectrometric analysis

All samples (aged and untreated, silylated and not silylated) are injected into the GC (Model CP 3800 gas chromatograph, Varian Technologies) at a split ratio of 1:10 after adding 2 μL of a deuterated PAH standard mixture (Table A.4). The programmed temperature vaporizer injector started for 1 min at 40°C followed by an increase of 50°C/min to 320°C and an isothermal time of 10 min at 320°C. For separation, a Rxi-HT5 column with 30 m length, 0.32 mm inner diameter and 0.1 μm film (Restek) is used. Helium with a purity of 99.999 vol-% is used as carrier gas with a constant flow of 2 mL/min. The GC oven is held at 30°C for 6 min followed by an increase of 5°C/min to 330°C and kept at the final temperature of 330°C for 15 min. The temperatures of the transferline and ion source are set to 300°C. The mass spectrometric analyses are performed with an Apex Qe Series II Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR) MS system (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) equipped with a 7 T magnet (Bruker Biospin, France) and a GC-APCI II source (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). Spectra are acquired from m/z 100 — 1000 with a two megaword transient size, resulting in an acquisition frequency of approximately 0.7 Hz and a resolving power of about 260,000 at m/z 200 and a mass accuracy error lower than 2ppm. All samples are measured as triplicates. The chromatographic peak widths (FWHM) for all internal standard substances were found to be below 0.25 min.

HR-MS data analysis

Data is pre-processed (peak picking and m/z -calibration) and exported using the Data Analysis software (DA 4.0, Bruker) and customized Visual Basic scripts. Further data processing is performed by applying custom-made Matlab (MATLAB R2014b) algorithms. Elemental compositions are assigned within a 2ppm error range to m/z ratios with a signal-to-noise level higher than nine according to the following elemental restrictions: $\text{C}_{6-100}\text{H}_{6-200}\text{N}_{0-2}\text{O}_{0-6}\text{S}_{0-2}\text{Si}_{0-6}$. Only species present in at least two of the three replicates are used for data analysis of the assigned elemental compositions. A detailed description of data processing approach is reported in literature (Schwemer et al., 2015; Rüger et al., 2017b).

Subsequently, the elemental composition is used to calculate the ring and double bond equivalents (DBE), according to the equation of McLafferty et al. (McLafferty and Turecek, 1993). The intensity of each detected species was afterward normalized by dividing by the summed intensity of all internal standard species. Outliers are detected by Dixon's Q-test ($\alpha = 95\%$) and excluded (Dean and Dixon, 1951). The identification of significant intensity changes of individual elemental compositions is conducted by a Student t-test (Student, 1908) with a significance level of 0.05.

Supplemental bulk analysis

Additional analyses are carried out to evaluate the results of the used methods and to validate the encountered effects. A SARA fractionation, as well as an elemental analysis and a determination of carbon-, hydrogen-, and nitrogen-content is conducted according to DIN 51732, sulfur content according ASTM D 4239 – 14 and DIN EN 15411 (metal content). The acid number is determined by potentiometric indication according to DIN EN 12634. Additionally, infrared spectroscopic measurements are conducted on a Bruker Tensor 27 with an attenuated total reflection unit. Temperature-dependent mass loss is accessed by thermogravimetric measurements utilizing a thermobalance (TG 209, Netzsch) with a temperature gradient of 10°C/min starting at 30°C (Rüger et al., 2015a; Rüger et al., 2017a).

3. Results and discussion

Prior to molecular level analysis based on the mass spectrometric results, IR- as well as elemental analysis information are discussed: The 70/100 bitumen sample revealed a bulk elemental composition typical for bitumen (Crump, 1981) (Table 1). Selected metal contents are listed in Table A1. During aging, only the sulfur content is decreased significantly, which indicates a decomposition/volatilization of sulfur-containing species.

Table 1 Excerpt of the elemental analysis from untreated and aged bitumen (n=3). Significant change between untreated and aged bitumen for the sulfur-content is highlighted in bold.

Elements	Untreated bitumen [w-%]	Aged bitumen [w-%]	Average content in bitumen according literature* [w-%]
Carbon	83.0 ± 1.4	83.2 ± 1.6	80.2 – 84.3
Hydrogen	9.6 ± 0.8	9.2 ± 0.6	9.8 – 10.8
Nitrogen	< 0.4	< 0.4	0.2 – 1.2
Sulfur	3.0 ± 0.3	2.2 ± 0.1	0.9 – 6.6

*(Crump, 1981)

The analysis of the IR spectra cannot provide clear indications for changes of sulfur-containing species but show an increase of the C=O band at wavenumbers around 1740 cm⁻¹ for the aged bitumen, which can be attributed to an increased concentration of carbonylic species. Besides this characteristic band, only two further bands (1028 cm⁻¹ and 1259 cm⁻¹), both belonging to aromatic core structures are significantly increased (Figure A.1 and A.2). The determined sample mass loss after the aging process is with 0.2 w% in the same range as reported for aging bitumen with the rolling thin film oven test (RTFOT) method (Van Gooswilligen, G., De Bats, F. T., & Harrison, T., 1989). Overall, the applied bulk analyses confirmed that the investigated 70/100 sample properties are within the characteristics of comparable bitumen types. Although changes within the IR and

elemental analyses are discovered, the complexity of the sample don't allow to reveal more detailed information about the changes in bitumen composition and the aging process.

Gas chromatography in combination with mass spectrometric detection enables more detailed insight into the individual constituents. Nonetheless, no chromatographic technique is able to resolve all compounds of bitumen, and a typical chromatographic hump is obtained. Here, high-resolution mass spectrometric detection is in particular advantageous, since the complex mixture elutes from the GC can be further separated on the m/z -axes. In return, the chromatographic separation enables the separation of isomeric structures.

The combination of chromatographic separation and high-resolution mass spectrometry results in an enormous amount of data. Therefore, data analysis and -mining is crucial and is divided into several steps. First, the chromatographic run is averaged and all mass spectrometric information is summed up to a single mass spectrum with assigned elemental compositions. As a result, 2,246 elemental compositions can be found in two of three measurement replicates of untreated bitumen and 2,241 in aged bitumen (Figure 1b). More than 99% of these elemental compositions (2,224) are present in both samples, which indicates that the aging process leads more to a shift in compound concentrations than in the formation of new compounds.

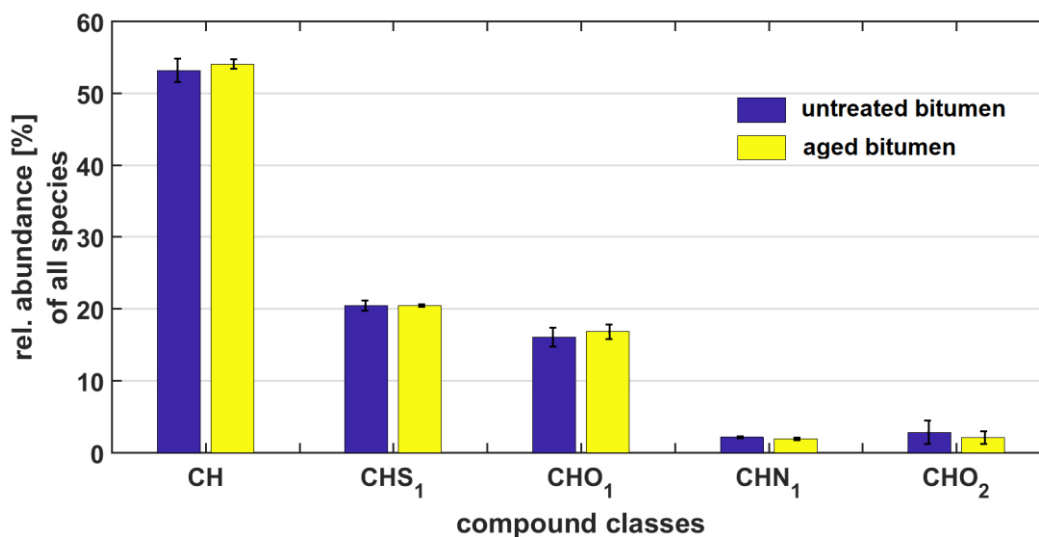


Figure 1. Intensity based major compound class distributions (> 5% summed intensity) from averaged mass spectra of untreated and aged bitumen.

The compound class distribution of all assigned elemental compositions indicates that most prominent detected species belong to the CH-, CHO₁- and CHS₁-classes (Figure 1). Unsaturated and aromatic hydrocarbons (CH) cover more than 53% of the overall abundance. No significant change of the compound class distribution caused by the aging process is observed (Figure 1). Furthermore, the high number of shared elemental compositions (99%) indicates the need for including individual signal intensity changes for a more in-depth data analysis.

There is only a small number of species, which are depleted during aging. Most of them belong to the CHN₁-class and are most likely benzacridine and carbazole derivatives. Unique species formed by aging are for instance compounds of the CHOS-class. Besides them, most of the detected species are common between untreated and aged bitumen. By calculating the intensity ratio, the changes of individual elemental compositions can be more easily evaluated:

$$ratio = \frac{I_{aged} - I_{untreated}}{I_{untreated} + I_{aged}}$$

The elemental compositions are sorted according to their number of heteroelements. If an elemental composition is more abundant in the untreated bitumen, the corresponding ratio is negative (blue), while for increased species in aged bitumen the corresponding ratio is positive (yellow). The following diagram (Figure 2) summarizes the results of this calculation. Color-coded circles indicate the areas in the molecular space, which are clearly affected.

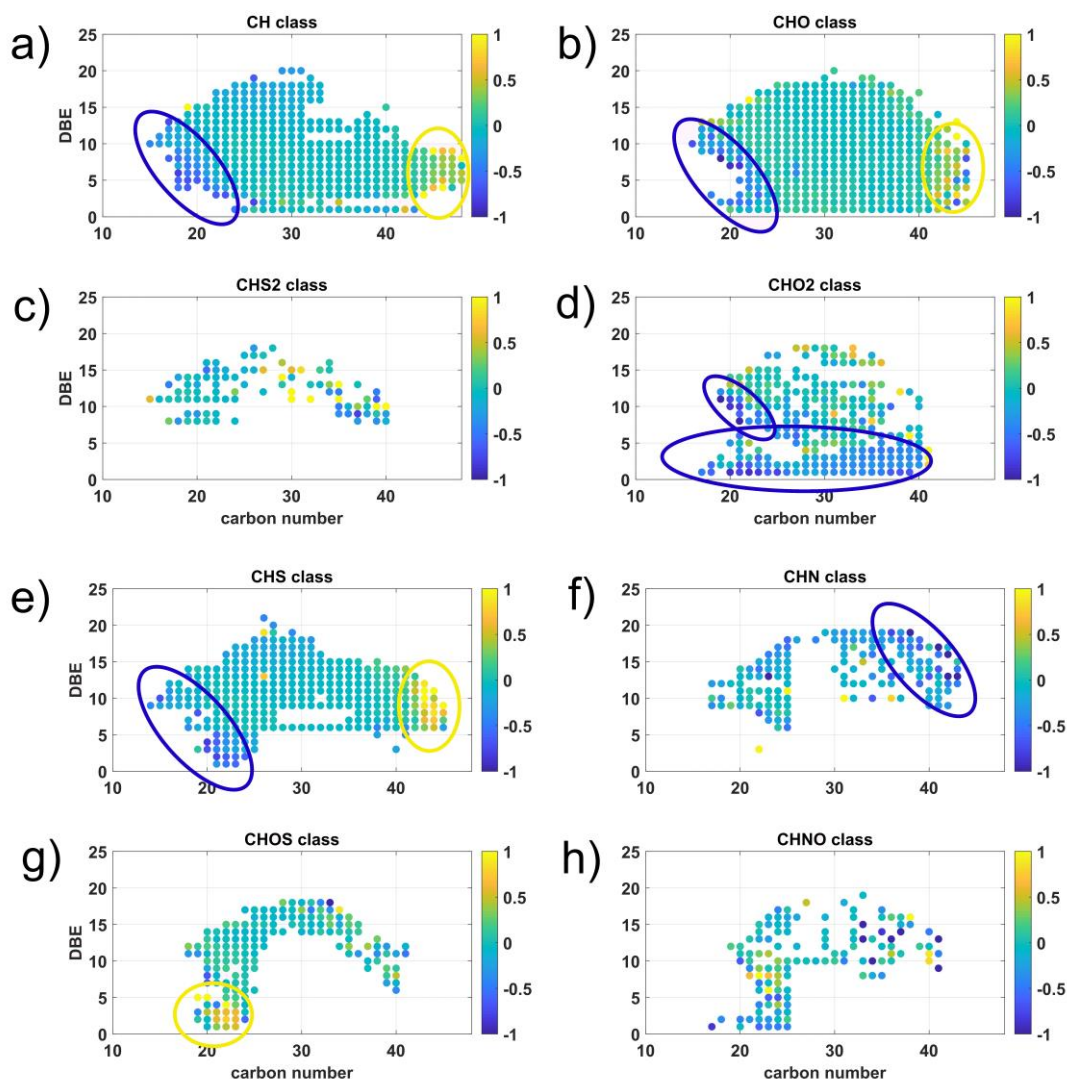


Figure 2. Intensity change of species from untreated to aged bitumen with ratio $([I_{aged} - I_{untreated}] / [I_{untreated} + I_{aged}])$ of compounds color coded, where negative values symbolizes a depletion (-1 = vanishing species) and positive values the formation (1= new species) in

aged bitumen; regions of validated, formed species are marked with yellow circles and regions of validated, depleted species with blue circles.

A more detailed analysis of the relative changes in composition between aged and untreated bitumen reveals that the most prominent changes appear at the borders of the compound class distribution (carbon number of 15 – 20 C-atoms and carbon number > 40 C-atoms). Thereby, elemental compositions with low carbon numbers often reveal a decrease of abundance, while elemental compositions with high carbon numbers are often enriched. Interestingly, compounds of the CHO₂-class and CHOS-class revealed a different behavior. Substances within the CHO₂-class with low DBE values (Figure 2d) are generally decreased independently of their carbon number. These are most likely different series of carboxylic acid esters, confirmed by retention time comparison with databases and missing silylation products during silylation step. The second interesting region is at low carbon and DBE values in the CHOS-class (Figure 2g). As shown later, these compounds most likely belong to sulfoxide species.

3.1. Volatilization

In the DIN-EN, standard bitumen is defined as: “virtually involatile, adhesive and waterproofing material derived from crude petroleum or present in natural asphalt, ..., and very viscous or nearly solid at room temperature”(DIN EN 12597:2014-08). Nevertheless, it is well known that during the lifecycle of bitumen, volatilization affects the chemical composition (Traxler, 1963). However, the detailed impact of volatilization and the affected substances are rarely investigated. For volatilization of a certain substance, its vapor pressure is crucial, which mainly depends on substance-specific properties. Using non-polar columns, GC primarily separates substances according to their vapor pressure, which is correlated to polarity, molecular weight and boiling point. Therefore, it is a suitable tool to investigate the impact of volatilization. Volatilization will affect mainly components with low retention index and low carbon number, as already indicated in Figure 2. Nonetheless, carbon number is not directly correlated to volatility and thus, Figure 3 combines the results of carbon number with the retention index (Kováts, 1958). Substances with high volatility are eluting at low retention times and are the most influenced species. With increasing retention time of the species, the effect of volatilization is reduced. As this trend is independent of chemical properties and reactions, the results indicated that low molecular weight species, containing 15 to 38 carbon atoms per molecule, are vaporized during aging. Compounds with retention indices up to 3,000 iu were found to be affected, which indicated that even high boiling compounds, in a boiling point range up to approx. 450°C, are affected by volatilization. Substances with a retention index higher than 3,000 iu (corresponding to C₃₀-alkane) offer lower depletion ratios and other effects become more present. The composition of the decreased species (Figure 3a) matches well with the composition of the whole sample (Figure 1a), which indicated that all species are affected independently of their chemical background.

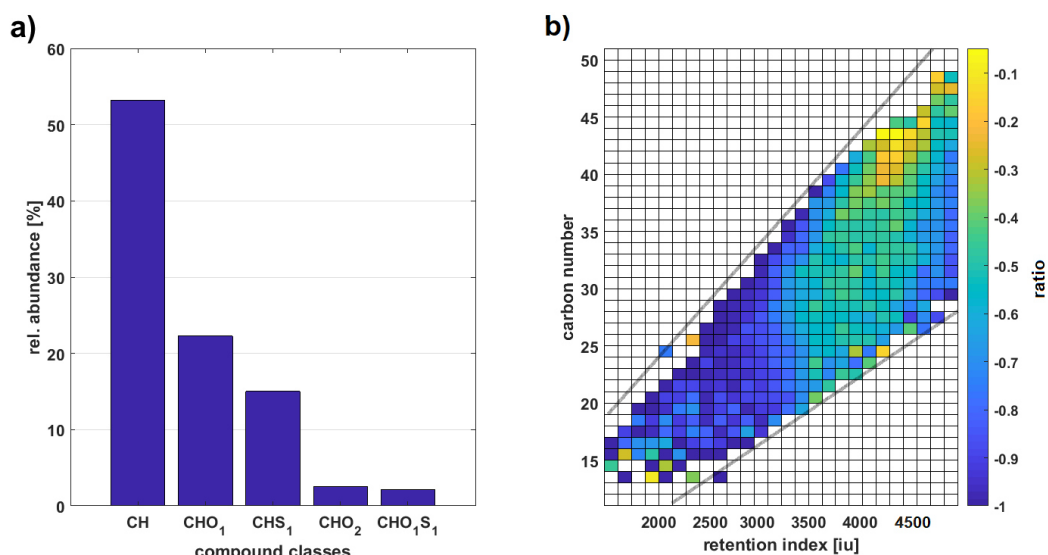


Figure 3.a) Compound class distribution of bitumen species depleted during aging; b) Retention index vs. carbon number diagram of these compounds with color coded ratio of change ($[I_{\text{aged}} - I_{\text{untreated}}] / [I_{\text{untreated}} + I_{\text{aged}}]$).

Regarding the composition of the affected compounds, most of them belong to the CH-class, more precisely to alkenes and low aromatic species due to the low DBE range (1 – 4 DBEs) of the found species (for instance benzene derivatives). The compounds with the lowest volatility are located at the lower limit of the compound distribution (lower grey line), in Figure 3b. Almost all of them belong to aromatic and heteroaromatic species, which exhibit lower volatility due to their aromatic ring system, π - π -bonds and the heteroatoms. That leads to the fact that for a fixed retention index the degree of saturation is increasing with raising carbon numbers. So, at the upper limit of the colored distribution are mostly saturated or compounds with low number of double bonds. Most of the found compounds containing 15 – 30 carbons mentioned in Figure 3b belong to pure hydrocarbons (e.g., alkenes and aromatic species). The outlier spots at small carbon numbers and retention indices, which exhibit lower depletion ratios are compounds, whose change ratios are additionally affected by further processes, e.g. formation by decomposition of higher species. Apparently, the depletion changes in general between a retention index of 3,000 to 3,500 iu (Figure 3b). The corresponding volatility seems to be the limit, up to where volatilization can be identified as is impacting factor.

Depletion of carboxylic acid esters

The data analysis of the bitumen revealed a notable decline of CHO₂-species with low aromaticity (DBE values from 1 to 6) (Figure 2d). In contrast to other depleted compounds, these species are distributed over a wide range of carbon numbers, which exceed the affected range of volatilization, discussed above. In summary, this depletion affects approx. 5% of the overall found elemental compositions. As an example, Figure 4 shows the decrease of a carboxylic acid esters (C₂₀ – C₄₀) in aged bitumen with the elemental composition C_nH_{2n-2}O₂ of more than two times. The averaged decrease within all assigned monocarboxylic acid ester varies between 20 – 70%. Thereby, the substances with lower retention indices exhibit a higher depletion.

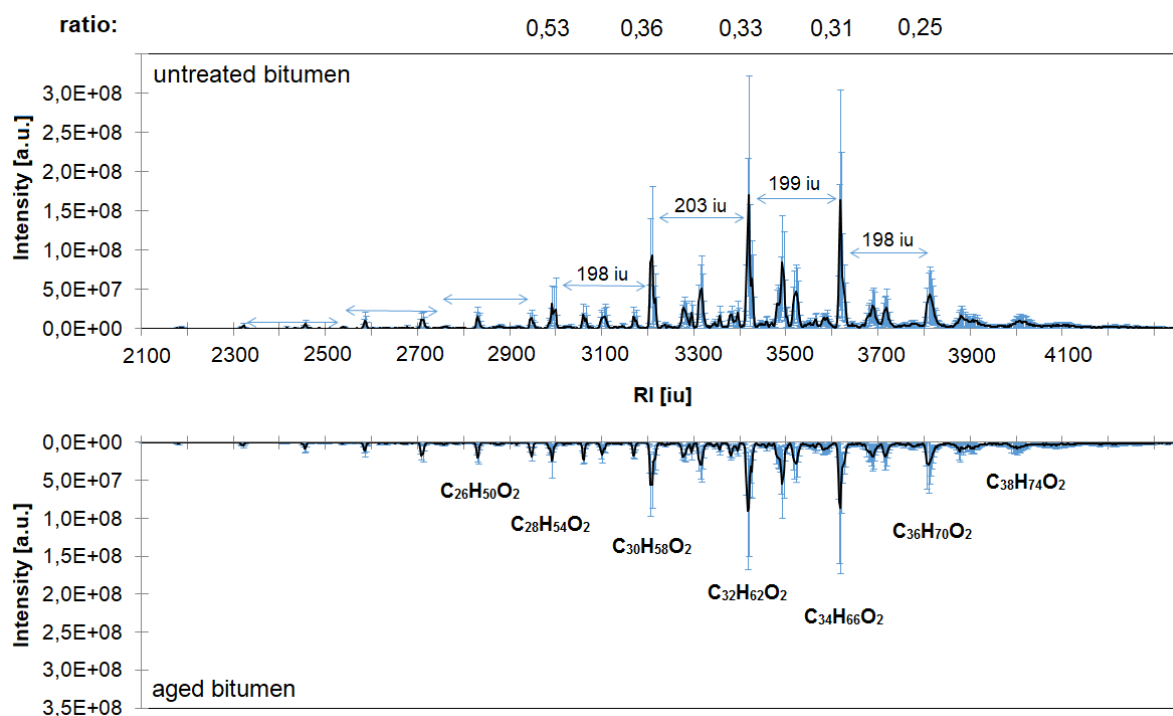


Figure 4. Averaged extracted chromatograms (EICs) of $C_nH_{2n-2}O_2$ -species with a DBE value of 2 (three replicates) and standard deviation displayed as error bars. In the upper chromatogram, which belongs to the untreated bitumen, the retention index differences of the even carbon numbered main members of the homologue series' are given. In the lower chromatogram the same extracted ion chromatograms (EICs) are displayed for aged bitumen with assigned elemental compositions. In the header the decrease of corresponding species from untreated to aged is given as ratio ($[I_{\text{aged}} - I_{\text{untreated}}] / I_{\text{untreated}} + I_{\text{aged}}$).

3.2. Depletion of sulfur compounds

As pointed out by the elemental analysis of the bitumen, the total sulfur content in the aged sample drops during aging by approximately 27 % from 3.0 ± 0.3 to 2.2 ± 0.1 w-%. This means, that sulfur containing substances have to evaporate during the aging process of the bitumen. The GC-APCI – FTICR MS data reveal no relevant depletion of sulfur containing species in any compound class. Only a decrease for CHS-class compounds with carbon numbers between 15 - 25 could be found, which cannot account entirely for the depletion of the sulfur content during aging. Furthermore, a formation of corresponding CHOS species is detected (Figure 2g) that are most likely oxidation products of CHS compounds. These species didn't contain an aromatic core structure, which is indicated by matching retention indices with databases. As described by Petersen et al. (Petersen et al., 1981) untreated bitumen that is not oxidized during the manufacturing process is practically free of sulfoxides. Only material that gets in contact with oxygen/ air is forming sulfoxide compounds. Furthermore, studies of Walling and Bullyky, as well as Herrington (Walling and Bullyky, 1964; Herrington, 1995) reported a thermal decomposition of asphalt sulfoxides, and Brandt and DeGroot identified hydrogen sulfide as primary volatile decomposition product during thermal treatment of bitumen at temperatures above 150 °C (Brandt, H., and P. De Groot, 1996). In summary, sulfoxides are rapidly formed during aging with oxygen, but these also start to decompose if thermally stressed. The drop of the sulfur content

detected by elemental analysis could not be assigned to any detected sulfur species, which leads to the thesis that evaporation of formed hydrogen sulfide could be the main reason for depletion of the sulfur content.

3.3. Formation of oxidation products

The applied derivatization procedure can access more information about the oxidation products and their structures. Oxidation products, which contain hydroxyl-, amino-, acid-, or thiol-groups should selectively react and form corresponding trimethylsilyl derivatives (a derivatization scheme is given in Figure A.6). By combining the mass spectrometric and the chromatographic information, these derivatives could be identified. Especially for the sulfur-containing compounds this combination is crucial, as the obtainable mass resolution alone (7 Tesla magnet and at comparable high repetition rate), was not sufficient for unambiguous formula assignment. For instance, in Figure 5 two different species are depicted with a mass difference of only 2.8 mDa. The first is a trimethylsilyl derivative of a compound with two hydroxyl-groups and the second are thiophene isomers, clearly separated by gas chromatography.

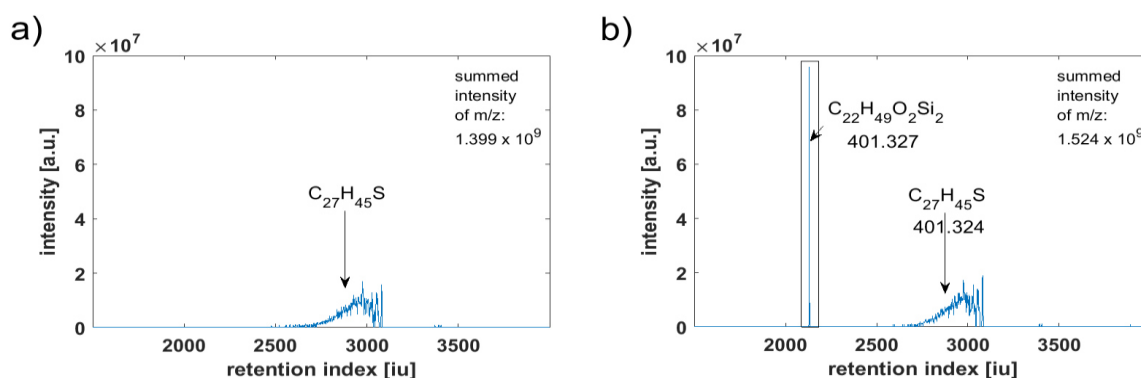


Figure 5. Extracted ion chromatogram of m/z 401.325 ± 0.002 in silylated untreated (a) and silylated aged bitumen (b) the corresponding isotope fine structure is given in the supplement Figure A.4

The number of formed reaction products found without derivatization is rather small. The silylation step raised the number of detectable species because most silylation products revealed increased volatility and thermal stability. Thereby, most frequently compounds of the CHO_2 -, CHN_1O_1 - and CHO_1 -class form silylation products (Figure 6).

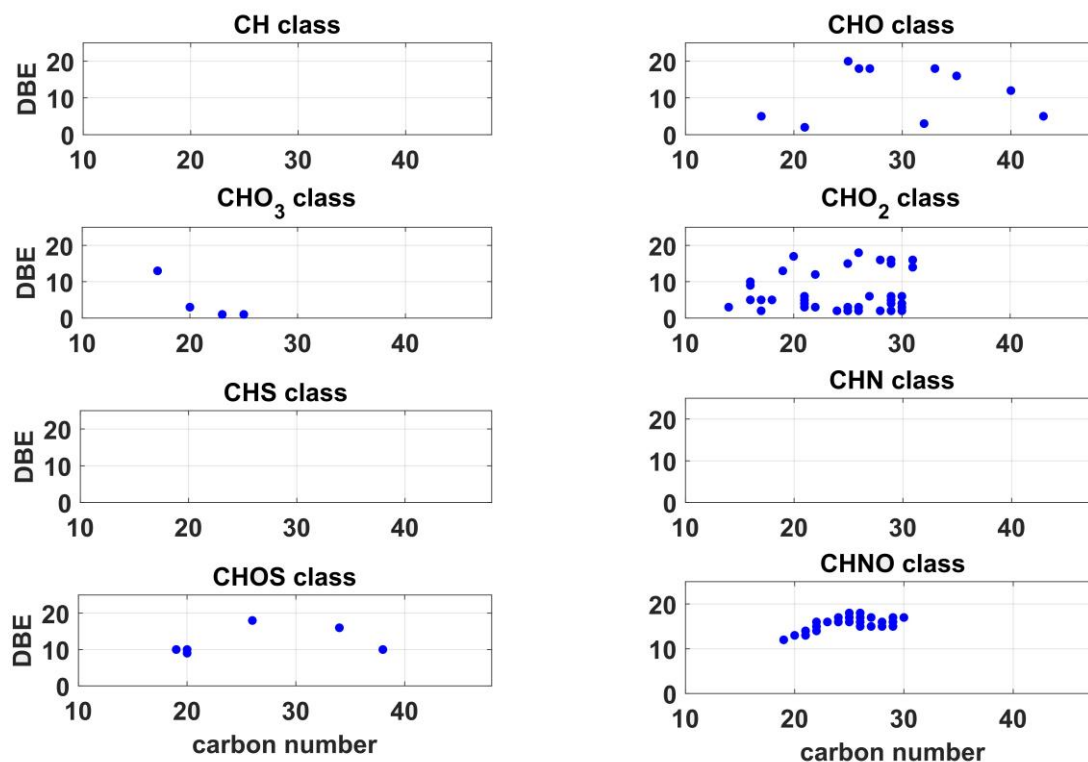


Figure 6. Carbon number vs. DBE plot of unique silylated compounds in aged bitumen (the silyl-groups are subtracted from the plotted elemental compositions in the compounds class diagrams).

Through derivatization with BSTFA, the number of oxygen-containing hydrocarbons in aged bitumen increased from about 2% to > 10%. As silylation extends the upper volatility limit of detectable compounds, especially the formation of larger, non-volatile oxidation products seems to be an essential aging process. Furthermore, most of the formed oxidation products had only one or two functional groups, and only a minor production of free acids was detected. The formed oxygen-containing aging products mostly exhibit DBE values of 5 or higher, which emphasizes the presence of aromatic ring structures.

4. Conclusion

In this study, we have shown that gas chromatography in combination with high-resolution mass spectrometry can be successfully applied to study the low- and semi-volatile constituents of untreated and thermally aged bitumen. The application of a silylation step prior to gas chromatography enables the evaluation of specific substance classes, such as alcohols, thiols or acids, which would without derivatization hard to determine or decomposed like acids.

Despite the limitation of the temperature range by GC, which allowed to only access the evaporable portion (5 - 10%) of the sample mass, more than 2,000 substances could be observed. Thereby, the most prominent depletion occurred for ester compounds. Volatilization for components with less than 38 carbons could be observed, which are also overlaid by other chemical reactions, like polymerization. Due to the used thermal aging procedure, it can be assumed that the release of

compounds occurred over a long period. Ester compounds acting as bitumen softener and, thus, their depletion is strongly correlated to the increase in hardness and brittleness. The application of derivatization increased the number of detected oxidation products within the CHO₂-, CHO₁- and CHN₁O₁-classes, which indicates that most of the formed oxidation products are non-volatile. The information about the involatile substances in bitumen and the effect of aging on them could be extended by using techniques like thermogravimetric analyses coupled to ultra-high resolution MS (Rüger et al., 2017a and Käfer et al., 2019).

The combination of GC and HR-MS helps to discover changes within the high-complex composition. Thereby, the reliability of elemental composition assignments of to the detected m/z ratios of chromatographic peaks is clearly enhanced. Especially for the sulfur-containing compounds this combination is crucial, as after the silylation step the obtainable mass resolution alone (7 Tesla magnet and at comparable high repletion rate), was not sufficient to distinguish between C₅S vs. H₄O₂Si₂ ($\Delta m = 2.8\text{mDa}$) components.

5. Acknowledgements

Funding by the Helmholtz Foundation for the HICE virtual institute (www.hice-vi.eu), by the Horizon 2020 program for the EU FT-ICR MS project (European Network of Fourier-Transform Ion-Cyclotron-Resonance Mass Spectrometry Centers, Grant agreement ID: 731077) and the state scholarship program, which are funded by the European Social Funds (ESF), is gratefully acknowledged. Furthermore, we thank the DFG for funding of the Bruker FTICR-MS (INST 264/56) and the Bruker Corporation for providing the APCI II source.

Associated content

Supporting information contain the analysis of the metal content, compound class distributions of untreated & aged bitumen and the intensity weighted average masses of the compound classes. Furthermore, the list of internal standard substances, as well as the mass analysis of the SARA fractionation is included. In addition, a scheme of the GC-APCI FTICR MS apparatus, the IR-spectra of both bitumen samples and the relative mass loss curves, a Carbon number vs. DBE plot of unique compounds in aged bitumen accessible after silylation, a Kendrick plot and isomeric fine structure of two elemental compositions are shown.

References

- AlHumaidan, F.S., Hauser, A., Rana, M.S., Lababidi, H.M.S., 2016. Impact of Thermal Treatment on Asphaltene Functional Groups. *Energy Fuels* 30, 2892–2903.
- Baek, C., Underwood, B., Kim, Y., 2012. Effects of Oxidative Aging on Asphalt Mixture Properties. *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board* 2296, 77–85.
- Barrow, M.P., Peru, K.M., Headley, J.V., 2014. An added dimension: GC atmospheric pressure chemical ionization FTICR MS and the athabasca oil sands. *Anal. Chem.* 86, 8281–8288.
- Brandt, H., and P. De Groot, 1996. Emission and composition of fumes from current bitumen types, Eurasphalt & Eurobitume congress, Strasbourg, 7-10 May 1996.
- Branthaver, J.F., Petersen, J.C., Robertson, R.E., Duvall, J.J., Kim, S.S., Harnsberger, P.M., Mill, T., Ensley, E.K., Barbour, F.A., Schabron, J.F., 1993. Binder characterization and evaluation: Volume 2: Chemistry SHRP-A-368. Washington DC: National Research Council. National Academy of Sciences.
- Cho, Y., Kim, Y.H., Kim, S., 2011. Planar limit-assisted structural interpretation of saturates/aromatics/resins/asphaltenes fractionated crude oil compounds observed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 83, 6068–6073.
- Crump, G.B. (Ed.), 1981. Black but such as in esteem - the analytical chemistry of bitumen, proceedings of the Chairman's Retiring Address to the NW Region Analytical Division of the Royal Society of Chemistry, London, UK.
- Dean, R.B., Dixon, W.J., 1951. Simplified Statistics for Small Numbers of Observations. *Anal. Chem.* 23, 636–638.
- DIN EN 12597:2014-08. Bitumen und bitumenhaltige Bindemittel—Terminologie, 1st ed. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth.de. Accessed 08.2014.
- Eurobitume (Ed.), 2015. The Bitumen Industry - A global perspective: Production, chemistry, use, specification and occupational exposure, third edition ed.
- Fialkov, A.B., Gordin, A., Amirav, A., 2003. Extending the range of compounds amenable for gas chromatography–mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A* 991, 217–240.
- Garrett, R.M., Pickering, I.J., Haith, C.E., Prince, R.C., 1998. Photooxidation of Crude Oils. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3719–3723.
- Gaspar, A., Zellermann, E., Lababidi, S., Reece, J., Schrader, W., 2012. Characterization of saturates, aromatics, resins, and asphaltenes heavy crude oil fractions by atmospheric pressure laser ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels* 26, 3481–3487.
- Halket, J.M., Zaikin, V.G., 2003, Derivatization in Mass Spectrometry - 1.Silylation. *European Journal of Mass Spectrometry* 9, 1-21.
- Handle, F., Harir, M., Füssl, J., Koyun, A.N., Grosseegger, D., Hertkorn, N., Eberhardsteiner, L., Hofko, B., Hospodka, M., Blab, R., Schmitt-Kopplin, P., Grothe, H., 2017. Tracking Aging of Bitumen and Its Saturate, Aromatic, Resin, and Asphaltene Fractions Using High-Field Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Energy & Fuels* 31, 4771–4779.
- Herrington, P.R., 1995. Thermal decomposition of asphalt sulfoxides. *Fuel* 74, 1232–1235.
- Huba, A.K., Gardinali, P.R., 2016. Characterization of a crude oil weathering series by ultrahigh-resolution mass spectrometry using multiple ionization modes. *The Science of the total environment* 563-564, 600–610.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2013. Bitumens and bitumen emissions, and some N- and S-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. IARC Press, Lyon.

- Käfer, U., Gröger, T., Rüger, C.P., Czech, H., Saraji-Bozorgzad, M., Wilharm, T., Zimmermann, R., 2019. Direct inlet probe - High-resolution time-of-flight mass spectrometry as fast technique for the chemical description of complex high-boiling samples. *Talanta* 202, 308-136.
- Kekäläinen, T., Pakarinen, J.M.H., Wickström, K., Lobodin, V.V., McKenna, A.M., Jänis, J., 2013. Compositional Analysis of Oil Residues by Ultrahigh-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Energy Fuels* 27, 2002–2009.
- Klein, G.C., Angström, A., Rodgers, R.P., Marshall, A.G., 2006a. Use of Saturates/Aromatics/Resins/Asphaltenes (SARA) fractionation to determine matrix effects in crude oil analysis by electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels* 20, 668–672.
- Klein, G.C., Kim, S., Rodgers, R.P., Marshall, A.G., Yen, A., 2006b. Mass spectral analysis of asphaltenes. II. Detailed compositional comparison of asphaltenes deposit to its crude oil counterpart for two geographically different crude oils by ESI FT-ICR MS. *Energy Fuels* 20, 1973–1979.
- Kováts, E., 1958. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta* 41, 1915–1932.
- Le Guern, M., Chailleux, E., Farcas, F., Dreessen, S., Mabilie, I., 2010. Physico-chemical analysis of five hard bitumens: Identification of chemical species and molecular organization before and after artificial aging. *Fuel* 89, 3330–3339.
- Lemkau, K.L., McKenna, A.M., Podgorski, D.C., Rodgers, R.P., Reddy, C.M., 2014. Molecular evidence of heavy-oil weathering following the M/V Cosco Busan spill: insights from Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Environmental science & technology* 48, 3760–3767.
- Lesueur, D., 2009. The colloidal structure of bitumen: Consequences on the rheology and on the mechanisms of bitumen modification. *Adv Colloid Interface Sci* 145, 42–82.
- Little, J., 1999, Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them, *Journal of Chromatography A* 844(1-2),1-22.
- Littke, R., Klusmann, U., Krooss, B., Leythaeuser, D., 1991. Quantification of loss of calcite, pyrite, and organic matter due to weathering of Toarcian black shales and effects on kerogen and bitumen characteristics. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55, 3369–3378.
- McLafferty, F.W., Turecek, F., 1993. Interpretation of Mass Spectra: Organic chemistry series. University Science Books.
- Oeder, S., Kanashova, T., Sippula, O., Sapcaru, S.C., Streibel, T., Arteaga-Salas, J.M., Passig, J., Dilger, M., Paur, H.-R., Schlager, C., Mülhopt, S., Diabaté, S., Weiss, C., Stengel, B., Rabe, R., Harndorf, H., Torvela, T., Jokiniemi, J.K., Hirvonen, M.-R., Schmidt-Weber, C., Traidl-Hoffmann, C., Bérubé, K.A., Wlodarczyk, A.J., Prytherch, Z., Michalke, B., Krebs, T., Prévôt, A.S.H., Kelbg, M., Tiggesbäumker, J., Karg, E., Jakobi, G., Scholtes, S., Schnelle-Kreis, J., Lintelmann, J., Matuschek, G., Sklorz, M., Klingbeil, S., Orasche, J., Richthammer, P., Müller, L., Elsasser, M., Reda, A., Gröger, T., Weggler, B., Schwemer, T., Czech, H., Rüger, C.P., Abbaszade, G., Radischat, C., Hiller, K., Buters, J.T.M., Dittmar, G., Zimmermann, R., 2015. Particulate matter from both heavy fuel oil and diesel fuel shipping emissions show strong biological effects on human lung cells at realistic and comparable in vitro exposure conditions. *PloS one* 10, e0126536.
- Petersen, J.C., 1994. Binder characterization and evaluation. Strategic Highway Research Program, National Research Council, Washington, D.C.
- Petersen, J.C., 2009. A Review of the Fundamentals of Asphalt Oxidation: Chemical, Physicochemical, Physical Property, and Durability Relationships. Transportation Research Board, Washington, D.C.

- Petersen, J.C., Dorrence, S.M., Nazir, M., Plancher, H., Barbour, F.A. (Eds.), 1981. Oxidation of sulfur compounds in petroleum residues: reactivity-structural relationships, Am. Chem. Soc., Div. Pet. Chem.
- Petsch, S.T., Berner, R.A., Eglinton, T.I., 2000. A field study of the chemical weathering of ancient sedimentary organic matter. *Org. Geochem.* 31, 475–487.
- Rüger, C.P., Miersch, T., Schwemer, T., Sklorz, M., Zimmermann, R., 2015a. Hyphenation of Thermal Analysis to Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry) Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization for Studying Composition and Thermal Degradation of Complex Materials. *Anal. Chem.* 87, 6493–6499.
- Rüger, C.P., Neumann, A., Sklorz, M., Schwemer, T., Zimmermann, R., 2017a. Thermal Analysis Coupled to Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry with Collision Induced Dissociation for Complex Petroleum Samples: Heavy Oil Composition and Asphaltene Precipitation Effects. *Energy & Fuels* 31, 13144–13158.
- Rüger, C.P., Schwemer, T., Sklorz, M., O'Connor, P.B., Barrow, M.P., Zimmermann, R., 2017b. Comprehensive chemical comparison of fuel composition and aerosol particles emitted from a ship diesel engine by gas chromatography atmospheric pressure chemical ionisation ultra-high resolution mass spectrometry with improved data processing routines. *European journal of mass spectrometry (Chichester, England)* 23, 28–39.
- Rüger, C.P., Sklorz, M., Schwemer, T., Zimmermann, R., 2015b. Characterisation of ship diesel primary particulate matter at the molecular level by means of ultra-high-resolution mass spectrometry coupled to laser desorption ionisation--comparison of feed fuel, filter extracts and direct particle measurements. *Anal Bioanal Chem* 407, 5923–5937.
- Sapcariu, S.C., Kanashova, T., Dilger, M., Diabaté, S., Oeder, S., Passig, J., Radischat, C., Buters, J., Sippula, O., Streibel, T., Paur, H.-R., Schlager, C., Mülhopt, S., Stengel, B., Rabe, R., Harndorf, H., Krebs, T., Karg, E., Gröger, T., Weiss, C., Dittmar, G., Hiller, K., Zimmermann, R., 2016. Metabolic Profiling as Well as Stable Isotope Assisted Metabolic and Proteomic Analysis of RAW 264.7 Macrophages Exposed to Ship Engine Aerosol Emissions: Different Effects of Heavy Fuel Oil and Refined Diesel Fuel. *PloS one* 11, e0157964.
- Schwemer, T., Rüger, C.P., Sklorz, M., Zimmermann, R., 2015. Gas Chromatography Coupled to Atmospheric Pressure Chemical Ionization FT-ICR Mass Spectrometry for Improvement of Data Reliability. *Anal. Chem.* 87, 11957–11961.
- Smith, D.F., Rodgers, R.P., Rahimi, P., Teclemariam, A., Marshall, A.G., 2009. Effect of Thermal Treatment on Acidic Organic Species from Athabasca Bitumen Heavy Vacuum Gas Oil, Analyzed by Negative-Ion Electrospray Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Mass Spectrometry. *Energy Fuels* 23, 314–319.
- Student, 1908. The probable error of a mean. *Biometrika*, 1–25.
- Traxler, R.N. (Ed.), 1963. Durability of asphalt cements (with discussion). *Proc. AAPT.* 32: 44.
- Van Gooswilligen, G., De Bats, F. T., & Harrison, T. (Ed.), 1989. Quality of paving grade bitumen—a practical approach in terms of functional tests, *Proc., 4th Eurobitume Symposium*, Madrid, Spain, October, 1989, pp. 290–297.
- Walling, C., Bullyky, J., 1964. Thermal Decomposition of Sulfoxides. *J. Org. Chem.* 29, 2699–2703.
- Weigel, S., Stephan, D., 2017. Modelling of rheological and ageing properties of bitumen based on its chemical structure. *Mater Struct* 50.
- Zuber, J., Kroll, M.M., Rathsack, P., Otto, M., 2016. Gas Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Pyrolysis Oil from German Brown Coal. *International Journal of Analytical Chemistry* 2016, 1–12.



Dipl. Chemiker Theo Schwemer

Kurzprofil:

- Zweieinhalbjährige Ausbildung und anschließende Berufspraxis als Chemielaborant in der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Rostock (LUFA)
- Extraktion, sowie Bestimmung TOC und anderer quantitativer Bestimmungen
- Studium der Chemie mit dem Abschluss: Diplom
- Promotion und Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Analytische Chemie
- Eigenständige Entwicklung, Umsetzung und Validierung einer Analysemethode GC HR-MS
- Interdisziplinäres, vernetztes Arbeiten im Rahmen des internationalen Forschungsprojektes Helmholtz Virtual Institute of Complex Molecular Systems in Environmental Health (HICE)
- Qualifizierung zum Beauftragten, Manager und Auditor im Qualitätsmanagement gemäß DIN EN ISO 9001 (TÜV)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Theo Schwemer
Geburtsdaten: 04.10.1983 in Rostock
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder
Nationalität: Deutsch

Berufliche Praxis:

- 11/2017 – heute **Software Tester** bei Agilent Technologies R&D and Marketing GmbH & Co.KG
- 10/2012 – 12/2016 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** am Lehrstuhl für Analytische Chemie, Institut für Chemie, Universität Rostock
- Eigenverantwortliche Planung und Durchführung der Forschungsarbeit
 - Methodenentwicklung, Umsetzung und Methodenoptimierung der Kopplung Gaschromatographie mit ultra-hochauflösender Massenspektrometrie (FTICR MS)
 - Datenvalidierung durch statistische Analyse (Umgang mit Programmiersprachen Matlab und R)
 - Interdisziplinäres, vernetztes Arbeiten im Rahmen des Helmholtz Virtual Institute of Complex Molecular Systems in Environmental Health (HICE) und Untersuchung der gesundheitsschädlichen Auswirkungen von Aerosolen auf den Menschen
 - Durchführung von Lehrveranstaltungen im Rahmen von Praktika sowie Betreuung von Bachelor- und Masterarbeiten
 - Systemadministration und Betreuung der IT-Technik
- 3/2007 – 9/2007 **Chemielaborant** an der Landwirtschaftlichen Umwelt- und Forschungsanstalt (LUFA) Rostock
- Nasschemische Analysemethoden zur Bestimmung von Total organischen Kohlenstoff (TOC), Stickstoff nach Kjeldahl, Zuckergehalt nach Luff-Schoorl, Fettgehalt mittels

- Soxhlet-Extraktion, Schwermetallen in Böden mittels Königswasserextraktion, Cyanidgehalts-Bestimmung
- Instrumentelle Analytische Messmethoden: Atomabsorptionsspektrometrie (AAS), Induktiv gekoppeltes Plasma – Optische Emissions Spektrometrie (ICP-OES, ICP-MS), Ionenchromatografie (IC), Bestimmung von Polychlorierten Biphenylen (PCB) und Dibenzodioxinen/-furanen (PCDD/F) in Futtermitteln mit MS, Bestimmung von Aminosäuren mittels High Pressure Liquid Chromatography (HPLC-MS), Bestimmung von Fettsäuren mittels GC-MS
- Erstellen von Arbeitsanweisungen

Ausbildung:

5/2017 – 6/2017	Qualifizierung zum Qualitätsmanagement Auditor (TÜV) nach DIN EN ISO 9001
4/2017 – 5/2017	Qualifizierung zum Qualitätsmanagement Manager (TÜV) nach DIN EN ISO 9001
3/2017 – 4/2017	Qualifizierung zum Qualitätsmanagement Beauftragten (TÜV) nach DIN EN ISO 9001
Seit 11/2012	Promotion am Lehrstuhl für Analytische Chemie, Institut für Chemie, Universität Rostock
10/2007 – 9/2012	Studium der Chemie an der Universität Rostock mit Spezialisierung auf Analytische Chemie Abschluss: Diplom Chemiker (Note: 1,7)
9/2004 – 2/2007	Ausbildung zum Chemielaboranten in der LUFA Rostock Abschluss: Chemielaborant
9/1990 – 7/2003	Richard-Wossidlo Gymnasium Ribnitz-Damgarten Abschluss: Abitur (Note: 2,5)

Fremdsprachen:

Englisch:	gute Kenntnisse in Wort und Schrift
Französisch:	Grundkenntnisse

Latein:

Grundkenntnisse

EDV-Kenntnisse:

MS-Office (sehr gute Kenntnisse in allen gängigen Anwendungen)

Programmiersprachen zur Datenstatistik (Matlab, R)

Umgang mit Grafikprogrammen zur Erstellung wissenschaftlicher Abbildungen (Adobe Photoshop, Corel Draw)

Administration, Betreuung und Wartung von Arbeitsplatzrechnern & Servern

Einrichtung und Neuinstallation von Betriebssystemen und Anwendungsprogrammen für Arbeitsplatzrechner

Laboratory Information Management System [LIMS] (Benutzerkenntnisse)

Hobbies:

Volleyball

Anlagen:

Diplomzeugnis

Abiturzeugnis

Zertifikat Qualitätsmanagement Beauftragter (TÜV)

Zertifikat Qualitätsmanagement Manager (TÜV)